



# 棘皮動物を用いた受精時の卵内カルシウムイオン遊離機構の研究

著者	橋 功
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第17128号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00096760">http://hdl.handle.net/10097/00096760</a>

博士論文

棘皮動物を用いた受精時の  
卵内カルシウムイオン遊離機構の研究

平成 28 年度

東北大学大学院生命科学研究科  
生命機能科学専攻

高橋 功

目次

要約 . . . . . 1

序論 . . . . . 3

材料と方法 . . . . . 8

結果 . . . . . 13

考察 . . . . . 25

謝辞 . . . . . 34

参考文献 . . . . . 35

図表 . . . . . 46

## 要約

受精は有性生殖を行う動物にとって新たな個体発生の開始に必須な反応であり、この時、有性生殖を行う動物に共通して、精子侵入時に卵内カルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 上昇が起こる。卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の際には、多くの動物に共通して、Inositol 1,4,5,-trisphosphate ( $\text{IP}_3$ ) 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が起こる。一方、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇には  $\text{IP}_3$  以外にも、cyclic ADP ribose, Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  上昇、卵細胞膜上の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介した卵外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入などが機能していると考えられている。すなわち、受精時にこれらの複数の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が協調して卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に関与しており、それらが相互に補完し合うために、受精過程に関与する個々の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構を詳細に解析し、その全容を明らかにしようとする時に困難を伴ってきた。

イトマキヒトデ卵母細胞中では、1-MA による卵成熟の進行に伴い卵内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が発達する。この時、 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は卵核胞の崩壊以降に発達する。一方、卵核胞崩壊前の卵成熟途上卵においても、 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の発達に先行して、媒精による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が大きくなることから、 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構以外の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が機能していると考えられた。そこで、卵成熟途上卵における  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の解析を組み合わせることにより、受精時に機能する複数の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇機構を包括的に解析できると考えられた。

本研究では、主に卵母細胞内で機能する  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構以外の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構について検証し、受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の全容を解明することを目的とした。その結果、卵成熟途上卵の段階から、媒精時に NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が機能し、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルと lysosome を介した卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を誘起することが明らかになった。NAADP は ADP-ribosyl cyclase (ADPRC) を介して Nicotinamid adenine dinucleotide phosphate (NADP) から産生される。NADP は卵成熟途上卵及び、成熟卵において卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を誘起した。卵成熟途上卵において NADP による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は C4479 により抑制された

が、NAADP による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は抑制されなかった。また、NADP と NAADP による  $\text{Ca}^{2+}$  wave の時空間的パターンは同様であったことから、NADP から NAADP が産生され、と考えられた。NADP-NAADP 産生系は 1-MA 添加無しで人為的に卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇、pH 上昇を引き起こすことにより活性化した。また、 $\text{IP}_3$ 、NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が未発達な未成熟卵においても媒精時に弱い  $\text{Ca}^{2+}$  上昇がみられ、この時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇には actin microfilament 系の関与する  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が機能するものと考えられた。

イトマキヒトデの受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇には actin microfilament 系の関与する  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が機能しており、これらの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は卵成熟の進行過程で順次活性化され、成熟卵受精時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に寄与する。

## 序論

受精とは一般には精子が卵に侵入し、卵内へ侵入した雄性前核と雌性前核が融合して新たな個体発生を開始することである。受精の成立は、有性生殖を行なう動物にとって必須の反応であり、精子侵入に伴って卵内のカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) の上昇が起こる。受精時に卵内  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇することは、現在のところ動物の受精時に普遍的な現象となっている (Stricker, 1999 ; Whitaker, 2006; Miyazaki, 2006)。

精子侵入時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は受精成立及び、発生開始に重要な役割を果たす。人為的に卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を起こすことで卵が活性化し、卵割が進行する (Washitani-Nemoto et al, 1994)。すなわち、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は細胞周期の制御に関与する。卵内では M-phase promoting factor (MPF) が活性化されると、細胞周期は細胞分裂前期から中期へ移行する。MPF は Cdc2 と cyclin B からなる複合体で、Cdc2 の脱リン酸化によって活性化する (Morla et al, 1989)。哺乳類や両生類では  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が引き金となって後期促進複合体・サイクロソームが活性化され、cyclin B を分解することで M 期から脱する (Reimann and Jackson, 2002; Markoulaki et al, 2003)。これらの活性化は、 $\text{Ca}^{2+}$  に結合するカルモジュリンによって調節されている。また、棘皮動物では遺伝子発現に関与する mitogen-activated protein (MAP) kinase が、 $\text{Ca}^{2+}$  により脱リン酸化され、失活することで DNA の合成が開始する (Kumano et al, 2001)。さらに、精子侵入直後の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は多精防御機構に機能している (Miyazaki, 2006; Ramos and Wessel, 2013)。この多精防御機構には「早く一時的」な機構と「遅く持続性」な機構の 2 種類があり (Gould and Stephano, 2003; Tsaadon et al., 2006; Dale, 2014)、それぞれ膜電位の変化、受精膜形成により多精受精を阻止している。受精時に精子による卵の膜電位変化が起こると電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが活性化し、卵外から  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、卵表層付近全体で一時的な  $\text{Ca}^{2+}$  上昇 (Cortical flash : CF) が起こる (Miyazaki, 2006; Moccia et al, 2006)。この時、静止電位が脱分極により一時的に 0 mV 付近まで上昇し (Jaffe, 1976; Miyazaki and Hirai, 1979)、両性配偶子間の膜融合を阻害

する。これに続いて受精膜が形成される。受精膜は、卵原形質膜の直下にある表層顆粒がエキソサイトーシスにより卵外マトリックスに放出され、卵表を覆う卵外被と反応することにより形成され、複数の精子の卵内への侵入を防ぐ (Gardner and Evans, 2006)。この表層顆粒のエキソサイトーシスにも卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が関係しており、精子侵入部位から開始した卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が対極に伝播することに対応して、受精膜も精子侵入点付近から卵表全周に形成される。

受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に関与する  $\text{Ca}^{2+}$  ソースとして、卵内の  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が機能していることは、マウス、ホヤ、アフリカツメガエル、ウニなど多くの動物卵で報告されている (Swann and Whitaker, 1986; Mizaki et al, 1993a, b; Hartzell et al, 1997; Yoshida et al, 1998)。 $\text{IP}_3$  は小胞体上にある  $\text{IP}_3$  受容体 ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) に結合し、小胞体上の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介して小胞体から卵細胞質中に  $\text{Ca}^{2+}$  を放出させる。 $\text{IP}_3$  は、ホスホリパーゼ C (PLC) により細胞膜の構成成分の一つであるホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 ( $\text{PIP}_2$ ) が加水分解されることで産生され、卵内では他にジアシルグリセロール (DAG) が生じる。哺乳類精子中には精子特有の PLC である  $\text{PLC}\zeta$  が同定され、受精時に精子が卵と融合するとこの  $\text{PLC}\zeta$  が卵内へ導入され、 $\text{IP}_3$  の産生、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇へと至る (Saunders, 2002)。棘皮動物は  $\text{PLC}\gamma$  の src homology-2 (SH2) domain ヘリン酸化チロシンキナーゼが結合することで  $\text{PLC}\gamma$  が活性化し、 $\text{IP}_3$  を産生する (Carroll et al, 1997, 1999)。しかし精子がどのように  $\text{PLC}\gamma$  を活性化するのか、また実際に受精時に精子により機能するのか明確になっていない。さらに哺乳類以外の多くの生物では、精子がどのように  $\text{IP}_3$  産生の引き金を引くのかは明らかではない。

$\text{IP}_3$  の他に、ウニやヒトデ卵において Cyclic ADP Ribose (cADPR) も受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を誘起する (Lee et al, 1993; Kuroda et al, 2001; Nusco et al, 2002)。cADPR は小胞体上の ryanodine receptor (RyR) に作用し卵細胞質中へ  $\text{Ca}^{2+}$  を遊離する。cADPR の他に  $\text{Ca}^{2+}$ 、ryanodine、caffeine も RyR に作用することで、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離が起こる (Fujiwara

et al, 1990)。

ウニでは、NAADP も卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を誘起する (Chini et al, 1995)。細胞内オルガネラである lysosome の機能を阻害すると NAADP による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が起こらないことから、NAADP による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は、lysosome を介した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離系が機能している

(Churchill et al, 2002)。NAADP は ADPRC を介して NADP と Nicotinic acid (NA) から産生される (Aarhus et al, 1995)。ADPRC は NAADP の産生の他に Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) から上述の cADPR も産生する (Lee et al, 1989; Rusinko and Lee, 1989; Lee and Aarhus, 1991)。ADPRC は哺乳類では細胞質中に存在し (Davis et al, 2008)、ウニでは卵表層と小胞内 (酸性) に局在する (Davis et al, 2008)。ADPRC の活性は pH、cyclic AMP (cAMP)、cyclic GMP (cGMP)、 $\text{Zn}^{2+}$  などにより調節されている (Wilson and Galione, 1998; Graeff et al, 1998; Zielinska et al, 2004)。

受精時には卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇と共に、卵表層 actin microfilament の構造変化が起こり、これも  $\text{Ca}^{2+}$  上昇と密接に関連する (Santella et al, 2012)。細胞表面の微絨毛や原形質膜下に存在する actin microfilament が  $\text{Ca}^{2+}$  Pool となり、actin microfilament の動態変化により  $\text{Ca}^{2+}$  が放出される (Lange, 1999)。また、成熟卵に actin microfilament の脱重合剤である latrunculin-A 処理を行うと、卵内の  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇する (Lim et al, 2002)。これらのことから、受精時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に、actin microfilament の関与も示唆される (Santella and Chun, 2011)。

受精時に機能すると考えられる  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は複数あるが  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は多くの動物卵に共通して機能していることから、受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇機構の研究は  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の解析を中心に行われてきた。(Miyazaki, 1993a,b)。しかし、コガモガイでは受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は卵外の  $\text{Ca}^{2+}$  が存在しないと正常に起こらない (Deguchi, 2007)。また、ウニ卵では  $\text{IP}_3$  の拮抗阻害剤である heparin により、 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構を阻害しても、受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が完全には抑制されない (Rakow and Shen, 1990)。



さらに、ウニでは受精時には卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が最大になることに先行して cADPR が産生され、 $\text{IP}_3$  濃度は受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が最大になった後に高くなることが報告されている (Kuroda et al, 2001)。以上のように、受精時には  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構以外の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構も重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、従来の解析方法では  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構による  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇の関与を除くことは難しい。すなわち、1 つの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構を阻害しても、他の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構がその分を補うことが考えられる。さらに阻害実験の場合、阻害剤の副作用や、本来受精時には機能しない  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構から  $\text{Ca}^{2+}$ が遊離し、補充される可能性も考えられる。実際、 $\text{IP}_3$  の拮抗阻害剤である heparin では、副作用として actin microfilament の過重合が起きる (Kyoizuka et al, 2008)。そのため、複数の阻害剤の使用は  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構の解析を複雑にする可能性がある。すなわち、他の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構からの補充、阻害剤の副作用が受精時の複数の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構を独立に解析する際の問題点となっていた。

棘皮動物イトマキヒトデ卵母細胞は、卵巣中では第一減数分裂前期の卵核胞（減数分裂開始前の核）(germinal vesicle, GV)を持った状態で卵成熟を休止している（未成熟卵）。この未成熟卵は受精、発生能を持たず、媒精により精子は卵内へ侵入する。しかし、この時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇は小さい (Chiba et al, 1990)。ヒトデ類の卵成熟誘起ホルモン 1-methyladenine (1-MA) が作用すると卵成熟の進行に伴い卵核胞の崩壊(germinal vesicle breakdown, GVBD)が起こり、受精、発生能を持つ成熟卵へ移行する (Kanatani, 1973; Guerrier and Doree, 1975)。成熟卵は受精により卵内  $\text{Ca}^{2+}$ が上昇する。すなわち、卵成熟の進行に伴い卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構も発達する。

本研究では卵成熟の進行途中（本研究では 1-MA 添加後 10 分と、20 分）の卵を卵成熟途上卵として用いた。卵成熟途上卵は、媒精による  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇が成熟卵とほぼ同等に上昇する。 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構は、卵核胞崩壊以降に発達してくるが (Lim et al, 2003)、卵成熟途上卵は卵核胞を持っているため、 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構は発達していないと考えら

れる。更に、卵成熟を誘起する閾値以下の 1-MA 処理により得られる表層成熟卵は、卵核胞を保持しているが、媒精により成熟卵と同様に卵内  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇し受精膜が形成される (Hirohashi et al, 2008)。そこで、卵核胞崩壊前の卵成熟途上卵を用いることにより  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構を除いた媒精時の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構を解析することができると考えられる。また、阻害剤複数を同時に使用しなくとも  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構以外の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の存在を明らかにできると考えられ、受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に関与する  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構を包括的に解析できることが期待される。

本研究では、卵母細胞内で機能していることが考えられる複数の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構について総合的な検討を行ない、受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の全容を解明することを目的とした。その結果、イトマキヒトデの卵成熟途上卵を用いることで受精時の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構を解析でき、受精時には  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、actin microfilament 系が関与する  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構がそれぞれ機能していることを明らかにした。

## 材料・方法

### 1. 実験材料

実験材料はイトマキヒトデ *Asterina pectinifera* (Müller and Troschel) を使用した。5 月初旬に産卵期にある神奈川県三浦半島付近のイトマキヒトデ、および 9 月初旬に産卵期にある陸奥湾の浅虫海洋生物学教育研究センター付近のイトマキヒトデを潜水により採集した。採集されたイトマキヒトデは腕の腹側に小穴を開けて雌雄及び生殖巣の成熟状態を確認した後、雌雄別に 15℃ から 20℃ の流海水中のタンク内で飼育した。

### 2. イトマキヒトデの配偶子の採取

イトマキヒトデ腕の腹側に鉋で切り込みをいれ、雌雄それぞれの個体の腕から卵巢片及び精巣片を取り出した。卵巢片は細断し、こぼれ出た卵母細胞を、濾過海水で 2・3 回洗浄した後、実験に使用した。精子は精巣片からしみ出したものを精子原液とし、媒精時には測定用チェンバーにセットした卵母細胞に対して、最終濃度が 100,000 倍になるように濾過海水で希釈した。

### 3. イトマキヒトデの卵成熟

卵巢から切り出された未成熟卵を、ヒトデ類の卵成熟誘起ホルモンである 1-Methyladenine(1-MA, SIGMA) を含む濾過海水中に入れ（最終濃度 1  $\mu$ M）、20 °C で必要な卵成熟ステージまでインキュベートし、実験に使用した。一部の実験では 1-MA の代わりに未成熟卵を 1  $\mu$ M ionomycin (Calbiochem) を含む濾過海水中に入れ、20℃ で 3 分間インキュベート後、通常の濾過海水中で必要な時間までインキュベートした。同様に未成熟卵を 1 mM NH<sub>4</sub>Cl (Wako) pH7.5 を含む海水中に入れ、20 °C で必要な時間までインキュベートし、実験に使用した。

#### 4. 顕微注射

カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 蛍光指示薬、阻害剤等の卵内への顕微注射は、平本及び岸本の方法をイトマキヒトデ用に変更を加えて行った (Kishimoto, 1986)。18x18mm のカバーガラス上に、カバーガラス小片をデンタルパラフィンでくさび形になるよう固定し、顕微注射用チェンバーを作製した。卵母細胞はこのチェンバー内に挟み込み、顕微注射を行った。顕微注射用のガラス針は、微小電極製作器 (PN-30, Narishige) を用いて芯入硝子管 (GC100TF-10, Harvard Apparatus) より作製した。ガラス針後端から試薬を充填し、マイクロインジェクションホルダー (MJ-2, Narishige) にセットした後、マイクロインジェクター (IM-300, Narishige) で高圧窒素ガスを用いた定量顕微注射を行った。注入量は卵母細胞の容積 (約 2,100 pL) のおよそ 2 パーセント に調整した。卵内  $\text{Ca}^{2+}$  測定用に用いた  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬 Calcium Green dextran 10,000 (CGD, Molecular Probes, 25 mg/ml stock solution) は、使用前にインジェクションバッファー (100 mM L-Aspartic acid, 10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.0) で 5 mg/ml に調製して使用した。Caged Ins(1,4,5) $\text{P}_3$  (caged  $\text{IP}_3$ , SIGMA) は、顕微注射直前に  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬との 1 : 1 混合液 (10 mg/ml CGD と 2  $\mu\text{M}$  caged  $\text{IP}_3$ ) を作成し、顕微注射を行った。顕微注射後、卵母細胞は直ちに濾過海水中に取り出し、処理開始まで 20°C の濾過海水中でインキュベートした。 $\text{IP}_3$  の拮抗阻害剤 heparin (SIGMA) および adenylyl cyclase の活性阻害剤 9-Cyclopentyladenine monomethanesulfonate (C4479, SIGMA) は顕微注射直前に  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬との 1 : 1 混合液を作成し (10 mg/ml CGD と heparin、C4479 それぞれ 20 mg/ml、400  $\mu\text{M}$ )、顕微注射を行った。顕微注射後、卵母細胞は直ちに濾過海水中に取り出し、測定開始まで 20°C の濾過海水中でインキュベートした。卵内 pH 変化の測定は、pH 蛍光指示薬 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein (BCECF, Molecular probes) をインジェクションバッファーで 1 mM に調整して使用した。

## 5. 阻害実験

卵成熟過程のタンパク合成を阻害するために、それぞれ転写阻害剤 100  $\mu\text{g/ml}$  Actinomycin D を含む 1  $\mu\text{M}$  1-MA 海水中、及び翻訳阻害剤 800  $\mu\text{g/ml}$  Puromycin を含む 1  $\mu\text{M}$  1-MA 海水中で未成熟卵を 40 分間インキュベートした後、NAADP を顕微注射し卵内  $\text{Ca}^{2+}$  を測定した。lysosome からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離を阻害する Glycyl-L-phenylalanine-beta-naphthylamide (GPN, Santa cruz Biotechnology) は、卵母細胞を 0.5mM の GPN を含む海水中で 10 分間前処理後に NAADP を顕微注射し卵内  $\text{Ca}^{2+}$  を測定した。卵外  $\text{Ca}^{2+}$  流入を阻害する L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤として、Verapamil (SIGMA)、Diltiazem (SIGMA)、Nifedipine (SIGMA) を用いた。それぞれ 100  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$  を含む海水中で卵母細胞を 10 分間前処理した後、NAADP を顕微注射し卵内  $\text{Ca}^{2+}$  を測定した。同様に、T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤として、 $\text{NiCl}_2$  (Wako)、Mibefradil (SIGMA) を用いた。それぞれ 50  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$  を含む海水中で卵母細胞を 10 分間前処理した後、NAADP を顕微注射し卵内  $\text{Ca}^{2+}$  を測定した。actin microfilament の重合阻害剤 Cytochalasin B (SIGMA) は、卵母細胞を 5  $\mu\text{M}$  Cytochalasin B を含む海水中で 5 分間前処理した後、媒精し卵内  $\text{Ca}^{2+}$  を測定した。

## 6. 卵内 $\text{Ca}^{2+}$ 、pH 測定

卵内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化は卵内に顕微注射されたカルシウム蛍光指示薬 CGD を励起波長 490 nm、吸収波長 510 nm を用いて、測光用蛍光顕微鏡 (Eclipse Ti, Nikon) に備え付けられた冷却 CCD カメラ (Cool SNAP MYO, Photometrics) により、透過像、蛍光像を 1 セットとして、1 秒もしくは 2 秒に 1 セットの画像を経時的に撮影した。得られた画像データは、NIS - Elements (Nikon) により蛍光強度を数値化し、解析した。データは変化前の蛍光強度値 ( $F_0$ ) を基準値 1 とし、変化後の蛍光強度値 ( $F$ ) をその比 ( $F/F_0$ ) として表した。この比を蛍光画像に適用し疑似カラーに変更した連続画像を作成した。疑似カラーとして

表した卵内  $\text{Ca}^{2+}$  変化は青が低く（青は相対値でおおよそ 1.0）、緑、黄、赤（赤は相対値でおおよそ 2.0）になるにつれ高くなるようにパラメーターを設定した。

卵内 pH 変化は、顕微注射された BCECF の励起波長 435、490 nm、吸収波長 530 nm を用いて、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化と同様に撮影した。それぞれの得られた蛍光強度を数値化し 490/435 nm の値から変化前の蛍光強度値 ( $F_0$ ) を基準値 1 とし、変化後の蛍光強度値 ( $F$ ) をその比 ( $F/F_0$ ) として表した。

測定時、卵母細胞は測光用チェンバーに挟み込んで固定した。測光用チェンバーは直径 3 cm のプラスチックシャーレの中央に直径 1 cm の穴を空け、その穴にカバーガラスに貼り付け、カバーガラスの上には厚さ 130  $\mu\text{m}$  の両面テープをはさんでカバーガラスの小片を貼り合わせ、上下 2 枚のカバーガラスに 130  $\mu\text{m}$  の隙間を作り、この隙間に卵を挟み込んだ。卵母細胞をセットしたチェンバー内は、500  $\mu\text{L}$  の濾過海水もしくは  $\text{Ca}^{2+}$  欠如海水 (450 mM NaCl, 9 mM KCl, 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 48 mM  $\text{MgSO}_4$ , pH8.2) で満たした。卵内に顕微注射した caged  $\text{IP}_3$  (5  $\mu\text{M}$ ) の活性化は、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  の測定中に 30 秒間の連続的な紫外線 (UV) 照射により行った。

## 7. 卵内 $\text{Ca}^{2+}$ 測定中の顕微注射

Cyclic Adenosine diphosphate ribose (cADPR, SIGMA)、Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP, SIGMA)、Nicotinamid adenine dinucleotide phosphate (NADP, SIGMA) (それぞれ最終濃度は 1 mM、100  $\mu\text{M}$ 、5 mM、)は、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  測定用チェンバー中にあらかじめ CGD を顕微注射した卵母細胞をセットし、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  測定中に顕微注射を行った。注入用の針は微小電極製作器 (PN-30, Narishige) を用いて硝子管 (GC100T-10, Harvard Apparatus) より作成し、更にマイクロフォーシ (MF-900, Narishige) で針の先端に角度をつけて使用した。顕微注射時には、針先は順番にシリコンオイル (TSF451-10, GE 東芝シリコーン)、蒸留水で満たし、測光用蛍光顕微鏡

にセットされた水圧式注入装置 (IM-5B, Narishige) に接続した。顕微注射する試薬はそれぞれの濃度に調整した後、ガラスキャピラリーの小片に詰め、測光用チェンバー中にワセリンで固定し、シリコンオイルを満たした。このキャピラリーから、一定容量を針先 (100 pL) に充填したのちに、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  測定中の卵母細胞に顕微注射を行なった。

## 結果

### 1 卵成熟の進行とそれに伴い発達する卵内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構

#### 1-1 卵成熟の進行と卵内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構の発達

未成熟卵母細胞にヒトデの卵成熟誘起ホルモンである 1-methyladenine (1-MA, 1  $\mu\text{M}$ ) を添加し卵成熟を誘起した。1-MA 処理後 20 分までは海水中に切り出された直後の未成熟卵と同様の形態を持ち、細胞質中には GV を保持していた。1-MA 添加後 20 分に GV の輪郭を形成する核膜の崩壊が始まり、1-MA 添加後 30 分で卵核胞中の核質が細胞質と混ざる卵核胞の崩壊が起こり、1-MA 添加後 40 分で卵母細胞中の細胞質はほぼ均一となった。

1-MA 添加前 (0 分) 及び 1-MA 添加後 10 分、20 分、40 分の卵成熟進行中の各卵成熟ステージの卵母細胞に媒精したところ、1-MA 添加前及び 1-MA 添加後 20 分までは受精膜の上昇は起こらなかったが、1-MA 添加 40 分後では媒精後 2 分以内に精子侵入部位付近から受精膜が形成した (図 4 D)。1-MA 添加前 (0 分) 及び 1-MA 添加後 10 分、20 分、40 分の各卵母細胞への媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 変化を測定した。媒精前の卵内に顕微注射された  $\text{Ca}^{2+}$  蛍光指示薬の蛍光強度値 (相対的卵内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を基準として  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を相対的に比較すると、1-MA 添加前 (0 分)、1-MA 添加後 10 分、20 分、40 分の卵母細胞でそれぞれ  $1.33 \pm 0.03$  倍 ( $n=23$ )、 $1.60 \pm 0.04$  倍 ( $n=33$ )、 $1.73 \pm 0.04$  倍 ( $n=26$ )、 $1.81 \pm 0.06$  倍 ( $n=37$ ) であった (図 1)。1-MA 添加前の未成熟卵母細胞においても低い卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が起こり、1-MA 添加 10 分以降の卵成熟途上卵では、未成熟卵と比較すると媒精により大きな卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が起こった。すなわち卵内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離能は卵成熟の進行に伴い増大した。 $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値への到達時間と卵内  $\text{Ca}^{2+}$  伝播速度を検討した。媒精直後に卵細胞質中で上昇を開始した卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値に対して、最大値の 10 パーセントから、ピーク値 (100 パーセント) に至るまでに要する時間を算出した。これらは、1-MA 添加前 (0 分)、1-MA 添加後 10 分、20 分、40 分の卵母細胞でそれぞれ、 $216.74 \pm 14.63$  秒 ( $n=6$ )、 $135.26 \pm 7.43$  秒 ( $n=6$ )、 $84.90 \pm 8.54$  秒 ( $n=6$ )、 $64.23 \pm 4.69$  秒 ( $n=6$ ) であった (図 2、表 1)。すな



わち最大値に到達する時間も、0 分に比べて 10 分以降は有意に速かった( $P<0.05$ )。また、この時  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値の 10 パーセントから 90 パーセントまでに要する時間から  $\text{Ca}^{2+}$  伝播速度を算出したところ、それぞれ、 $1.07 \pm 0.12 \mu\text{m/s}$  ( $n=7$ )、 $2.50 \pm 0.26 \mu\text{m/s}$  ( $n=7$ )、 $3.86 \pm 0.44 \mu\text{m/s}$  ( $n=7$ )、 $3.82 \pm 0.47 \mu\text{m/s}$  ( $n=7$ ) であった (図 3、表 2)。1-MA 添加前の未成熟卵母細胞に比べ、卵成熟を再開している 1-MA 添加後 10 分以降の卵母細胞では、精子による 卵内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離能が発達した。1-MA 添加後 20 分、40 分の卵母細胞における媒精による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値及びピーク値に至る時間に有意差はなかった( $P>0.1$ ) (図 3、表 2)。 $\text{Ca}^{2+}$  上昇の空間的变化をみると、媒精による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は 1-MA 添加前 (0 分)、1-MA 添加後 10 分、20 分、40 分の卵母細胞に共通して、精子侵入点から開始し、対極に向かって伝播する一過性の  $\text{Ca}^{2+}$  wave であった (図 4)。この時 1-MA 添加 40 分の卵でのみ  $\text{Ca}^{2+}$  波の対極への伝播に続いて受精膜が形成された。

以上のことより、1-MA 添加 10 分の卵成熟途上卵で未成熟卵と比較して  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値、伝播速度が増加し、1-MA 添加 20 分後には、それらは成熟卵と同様になった。

## 1-2 卵成熟の進行に伴う卵内 $\text{IP}_3$ 依存性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構の発達

受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇には  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が多く種の共通して機能しており (Miyazaki et al, 1993a,b)、ヒトデ成熟卵の受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇にも  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の関与が報告されている (Iwasaki et al, 2002)。卵成熟の進行に伴う  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の発達を検討するために、あらかじめ  $1 \mu\text{M}$  caged  $\text{IP}_3$  を顕微注射してある未成熟卵母細胞に 1-MA を添加して卵成熟を進行させた。1-MA 添加前 (0 分)、1-MA 添加後 10 分、20 分、40 分卵の各卵成熟ステージにある卵母細胞に 30 秒間紫外線を照射し、caged  $\text{IP}_3$  を活性化させ、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を測定した。この時、卵内の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は、それぞれ  $1.03 \pm 0.01$  倍 ( $n=11$ )、 $1.02 \pm 0.01$  倍 ( $n=14$ )、 $1.07 \pm 0.01$  倍 ( $n=11$ )、 $1.97 \pm 0.06$  倍 ( $n=14$ ) であった (図 5)。1-MA 添加後 10 分、20 分卵では、紫外線照射後の  $\text{IP}_3$  による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇

ピーク値は添加前の未成熟卵の値と有意差はなかった ( $P>0.1$ )。1-MA 添加後 40 分の成熟卵では caged  $IP_3$  の活性化による  $Ca^{2+}$  上昇が起こった (図 6)。この時に起こる卵内  $Ca^{2+}$  上昇は、卵表層全体から中心に向かう  $Ca^{2+}$  wave として伝播し、その後受精膜が形成された。卵核胞崩壊前の 1-MA 添加後 10 分、20 分の卵母細胞は、 $IP_3$  による卵内  $Ca^{2+}$  上昇が未成熟卵と同様に未発達であった。

媒精時には卵成熟途上卵においても、成熟卵とほぼ同様の  $Ca^{2+}$  上昇ピーク値に達する卵内  $Ca^{2+}$  上昇が起こった。この過程に  $IP_3$  依存性  $Ca^{2+}$  遊離機構が関与していないことを確認するため、 $IP_3$  依存性  $Ca^{2+}$  遊離機構の拮抗阻害剤である heparin を用いて  $IP_3$  依存性  $Ca^{2+}$  遊離機構を阻害した (Nilsson et al, 1988)。1-MA 添加前の未成熟卵母細胞に、1  $\mu$ M caged  $IP_3$  と 10 mg/ml heparin を顕微注射し、1-MA を添加した。1-MA 添加後 40 分の成熟卵において紫外線照射により卵内の caged  $IP_3$  を活性化したところ、卵内  $Ca^{2+}$  上昇ピーク値は  $1.09 \pm 0.02$  倍 ( $n=10$ ) であった。これは heparin を含まない caged  $IP_3$  のみ顕微注射した通常の成熟卵における卵内  $Ca^{2+}$  上昇ピーク値  $2.01 \pm 0.06$  倍 ( $n=9$ ) と比較して有意に低かった ( $P<0.01$ ) (図 7)。10 mg/mL heparin を未成熟卵に顕微注射して、1-MA 添加前 (0 分)、1-MA 添加後 10 分、20 分、40 分の卵母細胞に媒精し、卵内  $Ca^{2+}$  上昇を測定したところ、卵内  $Ca^{2+}$  上昇ピーク値は、1-MA 添加前 (0 分)、1-MA 添加後 10 分、20 分、40 分の卵母細胞でそれぞれ  $1.30 \pm 0.04$  倍 ( $n=10$ )、 $1.59 \pm 0.08$  倍 ( $n=8$ )、 $1.70 \pm 0.07$  倍 ( $n=10$ )、 $1.84 \pm 0.02$  倍 ( $n=10$ ) であった (図 8)。すなわち  $IP_3$  依存性  $Ca^{2+}$  遊離機構の発達状態に関わらず、卵成熟過程のいずれのステージにおいても、媒精時の  $Ca^{2+}$  上昇ピーク値と有意差はなかった ( $P>0.1$ )。

$IP_3$  は  $IP_3$  receptor を介して小胞体からの  $Ca^{2+}$  放出を引き起こすことで、卵内部の  $Ca^{2+}$  上昇を誘起する。一方マウスにおいて  $IP_3$  は transient receptor potential-3 を介して卵外からの  $Ca^{2+}$  流入を促進する (Song et al, 2015)。caged  $IP_3$  による卵内  $Ca^{2+}$  wave は卵表層から卵の中心方向へ伝播したことから (図 6)、卵外からの  $Ca^{2+}$  流入を検討した。L 型

Ca<sup>2+</sup>チャンネルを阻害する 100  $\mu$ M の Verapamil を含む海水、もしくは Ca<sup>2+</sup>欠如海水中で紫外線照射により caged IP<sub>3</sub> を活性化したところ、Ca<sup>2+</sup>上昇ピーク値はそれぞれ 2.09 $\pm$ 0.09 倍(n=4)、2.02 $\pm$ 0.14 倍(n=3)であった(図 9)。これらの値は、海水中で同様の紫外線照射を行ったコントロールの Ca<sup>2+</sup>上昇ピーク値 2.02 $\pm$ 0.10 倍(n=5)と比較して有意差はなかった(P>0.1) (図 9)。また、それぞれの紫外線照射による卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇パターンは海水中と同様に卵表層から中心方向に向かって伝播した。

以上の結果から IP<sub>3</sub> 依存性 Ca<sup>2+</sup>遊離機構による卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇は、卵外からの Ca<sup>2+</sup>流入には依存しておらず、細胞内から遊離されると判断された。媒精による卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇ピーク値、Ca<sup>2+</sup>伝播速度は、1-MA 添加後 10 分で増大していた。しかし、卵成熟過程のいずれのステージにおいても、精子による卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇は IP<sub>3</sub> 依存性 Ca<sup>2+</sup>遊離機構が機能しなくても起こった。ヒトデ受精時の IP<sub>3</sub> 依存性 Ca<sup>2+</sup>遊離機構は卵核胞が崩壊した 1-MA 添加後 40 分の成熟卵で上昇した。これらのことから、媒精による Ca<sup>2+</sup>上昇には IP<sub>3</sub> 依存性 Ca<sup>2+</sup>遊離機構以外に、他の Ca<sup>2+</sup>遊離機構も機能していることが示唆された。特に IP<sub>3</sub> 依存性 Ca<sup>2+</sup>遊離機構の未発達な卵核胞の崩壊直前の卵母細胞においてこの Ca<sup>2+</sup>上昇は顕著である。そこで以後は 1-MA 添加前の受精発生能をもたない未成熟卵、1-MA 添加 40 分の受精発生可能な成熟卵と、1-MA 添加後 20 分の卵成熟途上卵（場合によっては 1-MA 添加後 10 分の卵母細胞も含めて）を比較して解析を進めた。

## 2 NAADP 及び NADP 依存性 Ca<sup>2+</sup>遊離機構

### 2-1 NAADP による卵内 Ca<sup>2+</sup> 上昇の誘起

ヒトデやウニでは IP<sub>3</sub> 以外に cADPR や NAADP が卵内 Ca<sup>2+</sup>遊離に関与する (Lee et al, 1993; Santella et al, 2000)。そこで卵成熟の進行に伴うこれらのアゴニストに対する 卵内 Ca<sup>2+</sup>遊離反応性を検討した。1 mM の cADPR を 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 20 分、40 分の卵に顕微注射した結果、顕微注射後の卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇ピーク値は、それぞれ 1.07 $\pm$ 0.02

倍(n=3)、 $1.03 \pm 0.02$  倍(n=4)、 $1.03 \pm 0.02$  倍(n=4)であった (図 10)。ウニでは  $100 \mu\text{M}$  の cADPR で卵内  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇する (Lee et al, 1993)。しかし、イトマキヒトデ卵成熟途上卵と成熟卵において 10 倍の濃度の cADPR を卵内へ顕微注射しても、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は未成熟卵への注射時と同様で、cADPR による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇活性は上がらなかった。

$100 \mu\text{M}$  の NAADP を 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 20 分、40 分の卵母細胞に顕微注射したところ、いずれの卵成熟ステージにある卵母細胞でも卵中央に顕微注射した後に、30 秒の lag time に続いて、表層から内側向かって  $\text{Ca}^{2+}$  wave 起こった (図 11)。成熟卵では、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値が減衰を開始した時点で、卵表全体から受精膜形成が開始した。1-MA 添加前 (0 分)、添加後 20 分、40 分の卵母細胞に NAADP 顕微注射後の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値はそれぞれ  $1.66 \pm 0.04$  倍(n=12)、 $1.63 \pm 0.04$  倍(n=31)、 $1.68 \pm 0.05$  倍(n=21)であった (図 12)。NAADP により卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が起こり、この時 1-MA 添加前の未成熟卵 (0 分) でも  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇した。各成熟ステージの  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値の間には有意な差は見られなかった ( $P > 0.1$ )。一方、媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は、1-MA 添加前 (0 分) と比べて 1-MA 添加 10 分以降の卵母細胞は有意に上昇した ( $P < 0.01$ )。以上の結果より、NAADP による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は未成熟卵から既に備わっているが、未成熟卵においては、NAADP 自体がまだ産生されていないか、NAADP による  $\text{Ca}^{2+}$  遊離反応経路が機能しないことが示唆された。

## 2-2 NADP による卵内 $\text{Ca}^{2+}$ 上昇の誘起

NAADP で卵内  $\text{Ca}^{2+}$  が上昇したが、この時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 20 分、40 分において差がなかった。NAADP は NADP と NA から産生されると考えられる (Aarhus et al, 1995; Moreschi et al, 2006)。そこで、NADP ( $5 \text{ mM}$ ) を 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分の卵母細胞に顕微注射した。NAADP と同様に、卵中央に顕微注射後、30 秒の lag time があり、卵表層から中心方向へ  $\text{Ca}^{2+}$  wave が伝

播した (図 13)。卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分でそれぞれ  $1.32 \pm 0.04$  倍 ( $n=12$ )、 $1.47 \pm 0.06$  倍 ( $n=9$ )、 $1.56 \pm 0.07$  倍 ( $n=10$ )、 $1.66 \pm 0.06$  倍 ( $n=13$ ) であった (図 14)。卵成熟進行に伴う NADP による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は、1-MA 添加前から添加後 10 分の間で、1.32 倍から 1.47 倍へ上昇した。1-MA 添加後 10 分までに  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値が大きくなったことは、媒精時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇と類似のパターンであった。以上のことから、 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が未発達な 1-MA 添加後 10 分、20 分卵への媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は、NADP-NAADP 産生系の発達が関与することが示唆された。

### 2-3 卵成熟の進行に伴う卵内 NADP 依存性卵内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構の発達

NAADP は ADPRC の作用により NADP から産生されるが (Aarhus et al, 1995)、ADPRC の活性化に cAMP が重要な役割を担う (Xie et al, 2005)。cAMP 合成阻害剤 C4479 (0.2 mM) を顕微注射した未成熟卵を、1-MA 海水中で 20 分間処理後、NADP を注射し卵内  $\text{Ca}^{2+}$  変化を測定した。通常の 1-MA 添加後 20 分の卵と比較すると、 $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値がそれぞれ  $1.64 \pm 0.06$  倍 ( $n=5$ ) と  $1.29 \pm 0.02$  倍 ( $n=5$ ) であった (図 15)。

また、C4479 顕微注射卵 (1-MA 添加後 20 分) に NAADP を顕微注射したところ、 $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は  $1.51 \pm 0.05$  倍 ( $n=6$ ) となり、通常の成熟途上卵に NAADP を顕微注射した場合の  $1.60 \pm 0.08$  倍 ( $n=5$ ) と有意差はなかった ( $P>0.1$ ) (図 16)。以上の結果から、C4479 は NAADP による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を直接阻害するのではなく、NADP-NAADP 産生系を阻害し、この過程に ADPRC が関与することが示唆された。

媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に対する NADP-NAADP 産生系の関与を検討した。未成熟卵にあらかじめ C4479 (0.2 mM) を顕微注射した後、1-MA 添加前 (0 分)、1-MA 添加後 10 分、20 分、40 分の各卵成熟ステージにある卵母細胞に媒精した。卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は、それぞれ  $1.36 \pm 0.07$  倍 ( $n=5$ )、 $1.34 \pm 0.02$  倍 ( $n=8$ )、 $1.56 \pm 0.02$  倍 ( $n=7$ )、 $1.78 \pm 0.05$  倍 ( $n=8$ ) であった (図 17)。これを通常媒精時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値と比較したところ、0

分と 40 分の卵母細胞では影響がなかったが、10 分、20 分では  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値が有意に低かった ( $P<0.05$ )。1-MA 添加後 10 分、20 分卵では、媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に NADP-NAADP 産生系の関与、及び媒精時には ADPRC が機能していることが示唆された。

### 3 NAADP 依存性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構の活性化

#### 3-1 タンパク合成阻害による NAADP 依存性卵内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構への影響

媒精時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇に NADP-NAADP 産生系及び ADPRC の関与が示唆された。この過程に卵成熟過程のタンパク合成が関与しているのか検討した。転写阻害剤 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Actinomycin D を含む海水中に 1-MA を添加し、添加後 40 分の成熟卵に NADP を顕微注射し、 $\text{Ca}^{2+}$  を測定した。Actinomycin D を処理した成熟卵の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は  $1.64 \pm 0.01$  倍 ( $n=3$ ) であった (図 18)。この時の  $\text{Ca}^{2+}$  wave は、阻害剤を含まない成熟卵の場合と同様に、30 秒の lag time 後表層から内側へ伝播した。Actinomycin D で転写を阻害したところ、卵成熟過程で増大する NADP による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は、通常海水中での NADP 顕微注射と同様の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇であった。

翻訳阻害剤 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Puromycin を含む海水中に 1-MA を添加し、添加後 40 分の成熟卵に NADP を顕微注射し、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  を測定した。Puromycin 処理した卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は  $1.60 \pm 0.05$  倍 ( $n=3$ ) であった (図 18)。この時の  $\text{Ca}^{2+}$  wave は、Puromycin を含む海水中でも顕微注射直後に、 $\text{Ca}^{2+}$  wave が 30 秒の lag time の後、表層から内側へ強く伝播した。Puromycin を用いて卵成熟過程の翻訳を阻害したところ NADP による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は、通常海水中での NADP 顕微注射と同様の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇であった。

Actinomycin D、Puromycin を含む海水中でインキュベートされた成熟卵における NADP 顕微注射による  $\text{Ca}^{2+}$  wave は、これらの阻害剤を含まない通常の成熟卵における NADP、NAADP 顕微注射による  $\text{Ca}^{2+}$  wave と同様の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  wave を示した。ADPRC は卵成熟進行に伴い生成されるものではなく、未成熟卵に存在している可能性があり、卵成

熟の進行に伴い活性化すると考えられた。

### 3-2 卵内 $\text{Ca}^{2+}$ 及び pH 上昇の誘起による NADP 依存性卵内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構の発達

NADP-NAADP 産生系は、1-MA 添加後 10 分以内に発達したため、卵成熟の進行に伴い NADP-NAADP 産生系が活性化すると考えられた。未成熟卵に 1-MA を添加すると、一過性の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が起こる (Santella and Kyozuka, 1994)。これに引き続いて卵内 pH が 7.1 から 7.4 に上昇する (Harada et al, 2003)。未成熟卵の 1-MA による  $\text{Ca}^{2+}$  変化を測定したところ、 $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値に達した後約 3 分で  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値の 20 パーセント以下に減少した (図 19)。卵内  $\text{Ca}^{2+}$  の伝播は、植物半球から動物極方向へ走る一過性の  $\text{Ca}^{2+}$  wave であった (図 20)。一過性の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を人為的に起こすために、未成熟卵を 1  $\mu\text{M}$  ionomycin を含む海水中で 3 分間インキュベートし、卵内の  $\text{Ca}^{2+}$  を上昇させた。その後、通常海水中に戻して NADP を顕微注射し、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を測定した。 $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は、ionomycin 処理前 (0 分)、処理後 10 分、20 分、40 分でそれぞれ  $1.26 \pm 0.06$  倍 (n=5)、 $1.47 \pm 0.05$  倍 (n=10)、 $1.44 \pm 0.04$  倍 (n=11)、 $1.50 \pm 0.04$  倍 (n=17) であった (図 21)。Ionomycin 処理後 10 分の未成熟卵において、NADP 顕微注射による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は、ionomycin 処理前の未成熟卵への NADP 顕微注射時に比べて有意に上昇した ( $P < 0.05$ )。Ionomycin 処理後 10 分以降の未成熟卵では、さらなる顕著な増加は認められなかった。

1-MA の添加時の未成熟卵の pH を測定した。1 mM の BCECF を顕微注射した未成熟卵に、1-MA を添加した結果、添加直後に pH の上昇が開始し、約 20 分経過後に安定した (図 22)。2 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pH 7.5 を等量の海水に添加した時の未成熟卵卵内 pH 変化を測定した。 $\text{NH}_4\text{Cl}$  を添加した直後より pH の上昇が開始し、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加後約 50 分まで上昇が続いた (図 23)。未成熟卵に  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pH 7.5 を添加し、添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分で NADP を顕微注射した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を測定した。卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は、そ

それぞれ  $1.19 \pm 0.07$  倍( $n=5$ )、 $1.49 \pm 0.10$  倍( $n=3$ )、 $1.59 \pm 0.03$  倍( $n=5$ )、 $1.58 \pm 0.03$  倍( $n=5$ )であった(図 24)。NADP 顕微注射による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加 10 分後に既に添加前の未成熟卵に比べて有意に高く ( $P<0.01$ )、引き続いて 20 分後まで上昇した。 $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加後 20 分と 40 分の卵母細胞では  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値に有意差はなかった ( $P>0.1$ )。この結果は 1-MA 添加後の卵成熟の進行に伴う NADP による 卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値のパターンと類似であった。

1-MA による卵内の  $\text{Ca}^{2+}$  と pH を人為的に上昇させるために ionomycin と  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を同時に処理した卵へ NADP を顕微注射した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を測定した。Ionomycin と  $\text{NH}_4\text{Cl}$  の同時処理前、処理後 10 分、20 分、40 分で、 $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値はそれぞれ  $1.25 \pm 0.04$  倍( $n=5$ )、 $1.45 \pm 0.02$  倍( $n=6$ )、 $1.57 \pm 0.02$  倍( $n=4$ )、 $1.56 \pm 0.02$  倍( $n=5$ )であった(図 25)。以上の結果より、卵内の  $\text{Ca}^{2+}$ 、pH を上昇させた未成熟卵は処理開始 10 分後には、卵内の  $\text{Ca}^{2+}$ 、pH を上昇させなかった未成熟卵に比べて、NADP 顕微注射による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値が大きくなった。卵成熟過程における NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の発達に、細胞内 pH 及び  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が関与すると考えられた。卵成熟過程の進行に伴う ADPRC 活性化に、pH 及び  $\text{Ca}^{2+}$  が関与することが示唆された。

## 4 NAADP 依存性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構の $\text{Ca}^{2+}$ pool

### 4-1 Lysosome による卵内からの $\text{Ca}^{2+}$ 遊離

NAADP 顕微注射による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  変化の空間的解析において、表層付近から強い  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が起こった(図 11 参照)。NAADP による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は、卵表層付近の lysosome から放出される細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離と細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  の流入があると考えられている (Santella et al, 2000; Churchill et al, 2002)。Glycyl-L-phenylalanine-beta-naphthylamide (GPN) は、lysosome に作用することで、lysosome の機能を阻害する (Jadot et al, 1984)。0.5 mM



GPN を含む海水中でヒトデ成熟卵(1-MA 添加 40 分)に NAADP を顕微注射した時の  $\text{Ca}^{2+}$  変化を測定した。GPN 海水中と通常海水中で NAADP を顕微注射した成熟卵において、 $\text{Ca}^{2+}$ 上昇ピーク値がそれぞれ  $1.58 \pm 0.08$  倍( $n=4$ )、 $1.29 \pm 0.03$  倍( $n=6$ )であり (図 26)、 $\text{Ca}^{2+}$ 上昇ピーク値は GPN 海水中では 通常海水中に比べて有意に抑制された ( $P < 0.05$ )。

また、GPN 海水中で卵成熟を進行させ、各卵成熟ステージで媒精した時の  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇を測定した。1-MA 添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分の卵における、卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇ピーク値はそれぞれ  $1.29 \pm 0.15$  倍( $n=3$ )、 $1.63 \pm 0.06$  倍( $n=3$ )、 $1.62 \pm 0.04$  倍( $n=4$ )、 $1.69 \pm 0.04$  倍( $n=3$ )であった (図 27)。媒精後の卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇ピーク値は、対照卵の媒精時と有意差はなかった ( $P > 0.1$ )。しかし、ピーク後の卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 減衰は対照卵と比べて、GPN 海水中の卵の方が早かった (図 28)。媒精後の 卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇ピーク値以降の  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇持続時間の減少は成熟卵 (1-MA 添加後 40 分) でも起こったが、卵成熟途上卵において顕著であった (図 29)。すなわち媒精による卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 維持には lysosome 由来の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構の関与が示唆された。

#### 4-2. $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル を介した細胞外からの $\text{Ca}^{2+}$ の流入

NAADP による  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇のソースとして細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入している (Santella et al, 2000)。そこで、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル及び T 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを検討した。L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル阻害剤 100  $\mu\text{M}$  Verapamil 海水中で成熟卵 (40 分) に NAADP を顕微注射し  $\text{Ca}^{2+}$ 変化を測定した。通常海水中と Verapamil 海水中における卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇ピーク値は、それぞれ  $1.62 \pm 0.07$  倍( $n=6$ )、 $1.05 \pm 0.01$  倍( $n=6$ )であった (図 30)。同様に、L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル阻害剤である 100  $\mu\text{M}$  Diltiazem 海水中で NAADP を成熟卵に顕微注射し  $\text{Ca}^{2+}$ 変化を測定した。通常海水中と Diltiazem 海水中における卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇ピーク値は、それぞれ  $1.59 \pm 0.03$  倍( $n=4$ )、 $1.18 \pm 0.02$  倍( $n=3$ )であった (図 31)。同じ L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル阻害剤である 50  $\mu\text{M}$  Nifedipine 海水中で NAADP を成熟卵に顕微注射し  $\text{Ca}^{2+}$ 変化を測

定した。通常海水中と Nifedipine 海水中における卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は、それぞれ  $1.64 \pm 0.03$  倍( $n=4$ )、 $1.31 \pm 0.09$  倍( $n=3$ )であった (図 32)。

T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤である  $50 \mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$  を用いて NAADP を顕微注射し、 $\text{Ca}^{2+}$  変化を測定した。通常海水中と  $\text{NiCl}_2$  海水中における卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は、それぞれ  $1.66 \pm 0.09$  倍( $n=5$ )、 $1.83 \pm 0.03$  倍( $n=3$ )であった (図 33)。同様に  $5 \mu\text{M}$  Mibefradil 海水中で NAADP を顕微注射し、 $\text{Ca}^{2+}$  変化を測定した。通常海水中と Mibefradil 海水中における卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は、それぞれ  $1.61 \pm 0.06$  倍( $n=4$ )、 $1.74 \pm 0.07$  倍( $n=3$ )であった (図 34)。ウシやラットでは  $50 \mu\text{M}$  の  $\text{NiCl}_2$ 、 $5 \mu\text{M}$  の Mibefradil で T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを阻害できる (Fernández-Morales et al, 2015)。しかし、イトマキヒトデでは T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの阻害による、NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構を抑制することができなかった。以上の結果より、NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介した、卵外  $\text{Ca}^{2+}$  の流入も卵内  $\text{Ca}^{2+}$  を調節していると考えられた。

Verapamil 存在下では NAADP 顕微注射による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が抑制されたことから、卵成熟途上卵の媒精による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇には、lysosome や細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入も機能することが示唆された。そこで  $100 \mu\text{M}$  Verapamil 海水中で、それぞれの卵成熟ステージの卵母細胞に媒精し、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を測定した。1-MA 添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分における卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は、それぞれ、 $1.40 \pm 0.02$  倍( $n=7$ )、 $1.42 \pm 0.03$  倍( $n=12$ )、 $1.50 \pm 0.05$  倍( $n=12$ )、 $1.85 \pm 0.03$  倍( $n=4$ )であった (図 35)。この時、全ての成熟段階の卵母細胞で Cortical flash (CF) が起こった。未成熟卵 (0 分) と成熟卵 (40 分) では通常の媒精時と  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値がほぼ同様であった。しかし、卵成熟途上卵では通常の媒精時に比べて  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値が有意に低かった ( $P < 0.05$ )。このことから、卵成熟途上卵の媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇には、卵外の  $\text{Ca}^{2+}$  流入が関与していることが示唆された。

以上の結果から、NAADP による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇には、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介した卵外

からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入、及び lysosome からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離が関与し、これらは受精時にそれぞれ  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇、受精後の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  維持に関与していると考えられた。

## 5 媒精時の $\text{Ca}^{2+}$ 遊離に対する卵内 Microfilament 系の機能

### 5-1 actin の重合阻害剤存在下における媒精時の卵内 $\text{Ca}^{2+}$ 変化への影響

1-MA 添加前の未成熟卵（0 分）への媒精時にも弱い卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇は起こる。この時卵内  $\text{Ca}^{2+}$ ピーク値に heparin、C4479、GPN は影響がなかったことから別の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構が機能していると考えられた。細胞骨格を構成する microfilament 系も  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇に関与している（Lange, 1999）。そこで、actin microfilament の重合阻害剤、5  $\mu\text{M}$  cytochalasin B 存在下における媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇を測定した。1-MA 添加前（0 分）、添加後 10 分、20 分、40 分卵において、卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇ピーク値はそれぞれ  $1.15 \pm 0.04$  倍( $n=17$ )、 $1.25 \pm 0.08$  倍( $n=14$ )、 $1.61 \pm 0.13$  倍( $n=8$ )、 $1.84 \pm 0.13$  倍( $n=13$ )であった（図 36）。Cytochalasin B 海水中での媒精による卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇ピーク値と通常海水中での媒精による  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇ピーク値を比較して 0 分、10 分では卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇ピーク値は有意に低かった（ $P<0.01$ ）。卵成熟途上卵（20 分）と成熟卵において媒精による CF が起こり、精子侵入点から対極に  $\text{Ca}^{2+}$ wave が伝播した。しかし、未成熟卵と卵成熟途上卵（10 分）では CF が起こらず、卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇は、精子侵入点付近に留まり、 $\text{Ca}^{2+}$  wave は観察されなかった（図 37）。

以上の結果より、1-MA 添加前の NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構、 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構が未発達な未成熟卵及び 1-MA 添加後 10 分の卵成熟途上卵では媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇に主として actin microfilament 系が機能していると考えられた。

## 考察

### 1 はじめに

雌の卵巣中から切り出されたイトマキヒトデの未成熟卵卵母細胞は受精発生能を持たず、ヒトデ類の卵成熟誘起ホルモン 1-MA により卵成熟が進行し成熟卵へ至ると受精発生が可能となる。イトマキヒトデの卵母細胞は成熟の進行と共に媒精による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値が上昇し、卵核胞崩壊前の卵成熟途上卵も成熟卵とほぼ同様の高い  $\text{Ca}^{2+}$  ピーク値であった。しかし、卵成熟途上卵では、 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離能は未成熟卵と同様に低かった。したがって、卵母細胞内には  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構以外の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が存在し、精子により  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構とは独立に卵内で機能することが示唆された。

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離アゴニストの一つである NAADP を顕微注射すると、卵成熟の再開前の未成熟卵においても卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を誘起した。NAADP の前駆体である NADP を顕微注射すると、媒精時と同様に卵成熟の再開した卵成熟途上卵から  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値が増大し、この際の  $\text{Ca}^{2+}$  wave の発生も NAADP の顕微注射時と同様に起こったことから、NADP-NAADP 産生系の機能が考えられた。

1-MA による卵成熟再開時、卵内 pH の上昇と、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が起こる。卵内 pH の上昇と、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を人為的に起こすことで、未成熟卵でも NADP による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が誘起された。NADP は NAADP の前駆体であることから、NADP-NAADP 産生系の活性化が考えられる。卵成熟途上卵の NAADP による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は、GPN による卵細胞質中の lysosome の機能阻害により阻害された。また、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル 阻害剤で NAADP による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が抑えられた。以上のことから NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構には lysosome と L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが関与していた。L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤を含む海水中で媒精を行うと、卵成熟途上卵でのみ卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が抑制された。

未成熟卵母細胞では  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は未発達であった。更に、heparin、C4479、GPN、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤、いずれの阻害剤にお

いても卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が抑制されなかった。以上のことから、未成熟卵では  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構と NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構以外のその他の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の関与が考えられた。 $\text{Ca}^{2+}$  の上昇に細胞骨格を形成する actin microfilament の関与が考えられるため (Lange, 1999)、actin microfilament の重合阻害剤である Cytochalasin B 海水中で媒精したところ、未成熟卵と卵成熟途上卵（10 分）において卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇はほぼ完全に抑制された。

イトマキヒトデ卵内では  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、actin microfilament 系が関与する  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の 3 つが関与しており、NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構よりも早い段階で発達し、actin microfilament 系が関与する  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は未成熟卵から機能していることが明らかになった。

## 2 受精時の $\text{IP}_3$ 依存性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構及びその他の $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構の関与

多くの動物の受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は共通して  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が機能している (Miyazaki et al, 1993a,b; Runft et al, 2002)。イトマキヒトデ成熟卵においても、 $\text{IP}_3\text{R}$  の拮抗阻害剤である  $\text{IP}_3$  sponge をあらかじめ卵内に顕微注射しておくことで、受精や  $\text{IP}_3$  による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が抑制される (Iwasaki et al, 2002)。イトマキヒトデ卵成熟途上卵では媒精による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は既に成熟卵と同様に高かった。しかし、 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は未成熟卵と同様に未発達であった。また、卵成熟の進行と共に卵核胞の局在する動物極側から  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が発達する (Lim et al, 2003)。 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の発達には卵核胞の内容物が関与している (Vasilev et al, 2012)。実際、除核した卵に 1-MA を添加し、卵成熟を進行させても  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は発達しない (Lim et al, 2003)。したがって、卵成熟途上卵で  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は未発達であると考えられる。

Hirohashi ら (2008) により卵核胞を持っているが、媒精により成熟卵と同等に卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が起こる表層成熟卵が報告されている。表層成熟卵は本研究における卵成熟途上卵と同様に卵核胞を持っている成熟途上の卵であり、加えて媒精により成熟卵と同等の卵内

Ca<sup>2+</sup>上昇が起こる。表層成熟卵は、未成熟卵で卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇を誘起する 1/10 の濃度の IP<sub>3</sub> を顕微注射すると、成熟卵と同様に Ca<sup>2+</sup>上昇が起こることから、表層成熟卵においても IP<sub>3</sub> による関与が考えられた。(Hirohashi et al, 2008)。顕微注射では、針先から高濃度の IP<sub>3</sub> が注射されるため、針先周辺の IP<sub>3</sub> 濃度が高くなる。成熟卵で Ca<sup>2+</sup>上昇を誘起する 1000 倍の IP<sub>3</sub> を注射すると、未成熟卵においても成熟卵と同等の Ca<sup>2+</sup>が卵内へ遊離されることが報告されている (Chiba et al, 1990)。以上のことから IP<sub>3</sub> 顕微注射は局所的に IP<sub>3</sub> 濃度が高くなる。本研究では caged IP<sub>3</sub> と Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬を予め顕微注射しているため、caged IP<sub>3</sub> が卵全体に拡散し、局所的に高濃度とならず、この際には IP<sub>3</sub> による卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇は見られなかった。したがって、卵成熟途上卵と未成熟卵では IP<sub>3</sub> 依存性 Ca<sup>2+</sup>遊離機構が未発達であると考えられる。そこで、卵成熟途上卵の媒精時に機能する Ca<sup>2+</sup>遊離機構は IP<sub>3</sub> 依存性 Ca<sup>2+</sup>遊離機構以外の Ca<sup>2+</sup>遊離機構も機能していると考えられる。

### 3 成熟途上卵で機能する NADP-NAADP 産生系

NAADP は未成熟卵、卵成熟途上卵、成熟卵で同等の Ca<sup>2+</sup>上昇を誘起した。また、NADP は媒精時と同様に 1-MA による卵成熟の再開後に Ca<sup>2+</sup>上昇を誘起した。NAADP は ADPRC を介して NADP から産生される (Aarhus et al, 1995)。本研究において C4479 を顕微注射した卵成熟途上卵では NADP による Ca<sup>2+</sup>上昇が抑制された。ADPRC の活性化は cAMP 等の因子で制御されている (Graeff et al, 1998)。cAMP は adenylyl cyclase (AC) から産生される (Defer et al, 2000)。本研究で用いた C4479 は AC の阻害剤であり、cAMP の産生を阻害する。このことより、イトマキヒトデの卵内では ADPRC による NADP-NAADP 産生系が機能していると考えられる。すなわち、媒精時に上昇する卵成熟途上卵の Ca<sup>2+</sup>上昇は NADP-NAADP 産生系による Ca<sup>2+</sup>上昇であることが考えられる。

#### 4 卵成熟過程で活性化する NADP-NAADP 産生系

NADP-NAADP 産生系は、未成熟卵では活性が低く、1-MA 添加後 10 分以内に活性化し、卵成熟の進行と共に活性がより高くなる。NADP-NAADP 産生系は人為的に一過性の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇、卵内 pH の上昇を誘起することにより活性化された。すなわち、ADPRC の活性化には cAMP の他に  $\text{Ca}^{2+}$  や pH が関与していると考えられる。

一般的に ADPRC を介した NADP-NAADP 産生は酸性環境下で最も活性化する (Aarhus et al, 1995)。しかし、海水中に切り出されたイトマキヒトデの未成熟卵の卵内は、pH 7.1 であり 1-MA により卵成熟が開始し、成熟卵となった時の卵内はおおよそ pH 7.4 に上昇する (Harada et al, 2003)。通常のイトマキヒトデ未成熟卵卵内の内生理条件を適用すると、NAADP の産生は卵内の pH が酸性環境下時の活性は高い。すなわち、NADP による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値は未成熟卵の方が成熟卵よりも大きくなると考えられる。しかし、本研究では成熟卵の方が未成熟卵よりも卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値が高かった。細胞内には 2'-phospho-cyclic ADP-ribose (cADPRP) から ADPRC を介して NAADP を産生する経路も機能する (Moreschi et al, 2006)。また、cADPRP は NADP から ADPRC を介して産生される (Aarhus et al, 1995)。この反応は NADP から NAADP が産生される反応よりも優先される (Moreschi et al, 2006)。さらに、中性環境下でも cADPRP から NAADP を産生し、NADP から産生される NAADP より多い (Moreschi et al, 2006)。また、酸性環境下では NAADP の加水分解が促進されるが、逆に pH が高くなるほど抑制される (Graeff et al, 2006)。すなわち、イトマキヒトデの受精時に機能する NADP-NAADP 産生系は、ADPRC を介した NADP から cADPRP、続いて NAADP が産生される経路が考えられる。

## 5 NAADP の作用機構

NAADP による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は lysosome、外部からの流入した  $\text{Ca}^{2+}$  である (Santella et al, 2000; Churchill et al, 2002)。イトマキヒトデでは NAADP を卵中央付近に顕微注射した場合でも、卵表層から内側に  $\text{Ca}^{2+}$  wave が伝播した。そのため、卵表層付近にある lysosome、あるいは、外部からの流入によって 卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が起きたと考えられた。イトマキヒトデ卵において NAADP による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇には lysosome と L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが関与していた。しかし、NAADP による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は L 型チャンネル阻害剤 (Verapamil) で完全に抑制された。ラットでは lysosome に NAADP に感受性がある  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルがあり、これは L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルと薬理学的に類似の L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル 阻害剤で阻害される (Zhang and Li, 2007)。すなわち、Verapamil によって L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル、lysosome からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離が阻害されたことで、完全に  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が抑えられたと考えられる。

卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は多精防御機構にも機能する。棘皮動物の受精時に機能する多精防御機構は、時間的に早い一時的な防御機構として膜電位の変化 (脱分極) が起こり (Steinhardt et al, 1971) 続いて持続性の多精防御機構である受精膜の形成が起こる。脱分極時には卵外から  $\text{Ca}^{2+}$  が流入し、cortical flash が起こり (Shen and Buck, 1993)、この脱分極に NAADP が関与する (Moccia et al, 2004)。本実験では L 型と T 型の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを阻害し、NAADP による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を比較すると、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤では NAADP による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇が抑えられた。しかし、T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤では  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を抑制することが出来なかった。これは、NAADP による電位の変化と T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの活性化電位領域が異なるためであると考えられる。L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの活性化電位領域は、-40 mV から 0 mV であり、T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル活性化電位領域は、-60 mV から -20 mV である (Perez-Reyes, 2003; Buraei et al, 2015)。イトマキヒトデ成熟卵の静止膜電位は -50 から -10 mV 付近にあり (Miyazaki and Hirai, 1979)、受精時の精子侵入に伴う卵の膜電位変化 (脱分極) により 0 mV 付近まで上昇することから、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの関与が



支持される。

## 6 表層 actin microfilament の卵内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構への関与

近年卵表層の actin microfilament は、受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇や受精膜の形成に密接に関連することが指摘されている (Santella and Chun, 2011)。Actin microfilament の関与した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇は、微絨毛や原形質膜直下の actin microfilament が  $\text{Ca}^{2+}$ の貯蔵庫となっており (Lange, 1999; Lange and Gartzke, 2006)、actin の動態が変化すること (重合、脱重合) が  $\text{Ca}^{2+}$ 放出と密接に関連する (Lange, 1999)。 *Astropecten aurantiacus* 成熟卵を actin filament の脱重合剤である latrunculin-A 海水中でインキュベートすると、表層付近の卵内  $\text{Ca}^{2+}$ が上昇し受精膜形成が起こる (Lim et al, 2002)。また、未成熟卵への 1-MA 添加時に卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇が起こり、これは植物半球から動物極側へ走る  $\text{Ca}^{2+}$  wave である (Santella and Kyouzuka, 1994)。この反応は latrunculin-A 海水中で抑制される (Kyouzuka et al, 2008)。ヒトデ未成熟卵卵表は微絨毛で覆われており、1-MA 添加直後に微絨毛の短縮が起こる (Schroeder and Stricker, 1983)。この現象は 1-MA による  $\text{Ca}^{2+}$  wave の発生と時間的に一致する。これらのことから、未成熟卵表層の actin microfilament は  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離に関与している可能性が考えられる。本研究における cytochalasin B による媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇の抑制は ADPRC が活性化される以前と考えられる未成熟卵、及び早いステージの卵成熟途上卵 (1-MA 添加後 10 分) に顕著であった。一方卵成熟途上卵 (1-MA 添加後 20 分) 以降は、cytochalasin B による媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇抑制の影響を受けなかった。卵成熟途上卵、成熟卵においては NADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構、 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構が機能することによって  $\text{Ca}^{2+}$ が上昇とすると考えられる。以上のことから、媒精時には卵表層の actin microfilament も卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇に関与しており、actin microfilament の関与する卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇機構は 1-MA 添加前の未受精卵から機能すると考えられる (図 38、39 緑円)。

## 7 イトマキヒトデ精子により引き起こされる $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構

イトマキヒトデ精子侵入時に生じる一過性の卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 変化は、卵表層の  $\text{Ca}^{2+}$ が上昇する CF、急速に卵全体に  $\text{Ca}^{2+}$ が伝播する  $\text{Ca}^{2+}$  wave、その後緩やかに  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が減少する  $\text{Ca}^{2+}$ 減衰期の 3 つの段階に分けることが出来る (図 39)。

CF は脱分極による膜電位の変化によって、卵外から  $\text{Ca}^{2+}$ が流入し (Shen and Buck, 1993)、この  $\text{Ca}^{2+}$ の流入には NAADP が関与している (Moccia et al, 2004)。NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構は未成熟卵から既に卵内で機能するため、媒精後に NAADP が産生されると考えられる。ウニの精子は NAADP が存在する (Billington et al, 2002; Churchill et al, 2003)。しかし、イトマキヒトデ精子でも  $\text{Ca}^{2+}$ 流入による CF が起こることから、少量の NAADP が輸送される可能性がある。しかし、Verapamil により L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルが阻害されても、媒精による CF が起こった。また、actin microfilament 系も  $\text{Ca}^{2+}$ の流入に関与していると考えられている (Welnhöfer et al, 1999)。さらに、本研究において actin microfilament 系の重合阻害時には、未成熟卵と成熟途上卵 (10 分) で媒精時の CF が起こらなかった。このことから actin microfilament 系も  $\text{Ca}^{2+}$ の流入に関与していると考えられる。すなわち、CF には NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構と actin microfilament 系がそれぞれ関与していると考えられる。

$\text{Ca}^{2+}$  wave には  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構、NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構、actin microfilament 系の  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構が関与している。卵母細胞に NADP、NAADP が存在すれば、精子がなくとも直ちに NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇が起こると考えられる。そこで、NADP は卵内には存在せず、NAD kinase を介して NAD と ATP から合成され、この NAD kinase は  $\text{Ca}^{2+}$ により制御される (Epel et al, 1981)。すなわち、媒精による卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇により NAD kinase が活性化し、NAD より NADP が合成される。

未成熟卵内で NAD kinase が存在していると、1-MA により活性化され NADP が合成され、卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇が起こると考えられる。しかし、1-MA による  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇は L 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャ

ンネルにより抑制されない (Limatola et al, 2015)。そのため、未成熟卵に NAD kinase は存在せず、卵成熟の進行に伴い合成されると考えられる。actin microfilament 系も actin の重合阻害により未成熟卵では  $\text{Ca}^{2+}$  が伝播しないため  $\text{Ca}^{2+}$  wave に関与している。また、1-MA 添加時の  $\text{Ca}^{2+}$  wave は actin の過重合により阻害される (Kyojuka et al, 2008)。すなわち、actin microfilament 系も  $\text{Ca}^{2+}$  wave の伝播に関与している。

卵内  $\text{Ca}^{2+}$  の維持には  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構と NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が機能している。lysosome の機能阻害時の卵成熟途上卵、成熟卵において卵内  $\text{Ca}^{2+}$  減衰が早くなる。しかし、卵成熟途上卵の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  減衰は、成熟卵よりも速い。成熟卵は卵成熟途上卵と異なり  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が発達しているため、卵成熟途上卵よりも卵内  $\text{Ca}^{2+}$  の減衰が遅れると考えられる。以上のように卵内では複数の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離系が協調して機能している。

## 8 まとめ

従来の方法では、受精過程の個々の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構を詳細に解析することは困難を伴ってきた。しかし、本研究で用いたイトマキヒトデ成熟途上卵により、個々の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構を解析することが可能となり、以下のことが明らかになった。①イトマキヒトデの受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇には  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、actin microfilament 系の関与する  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が機能する。②これらの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は卵成熟の進行と共に発達する (図 38)。③NAADP は卵内で NADP から産生される。NAADP 産生には一般的に ADPRC が関与していると考えられている。NADP-NAADP 産生系は ADPRC 同じ活性化因子を持つため、イトマキヒトデ卵内の NAADP 産生には ADPRC の関与が考えられる。

今後の課題として  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、NAADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、actin microfilament 系の関与する  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が、精子によりどのように引き金を引かれるのかを検討すると共に、これらの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が相互に関連しているのかを検討する。また、

NADP-NAADP 産生系には ADPRC が関与していると考えられているため、イトマキヒト  
デ ADPRC の同定を試みる。

## 謝辞

本研究を行うにあたりご指導いただいた東北大学大学院生命科学研究科附属浅虫海洋生物学教育研究センター経塚啓一郎准教授に心より感謝申し上げます。博士論文審査にあたり熊野岳教授、占部城太郎教授、田村宏治教授、武田哲助教授、美濃川拓哉准教授に多くご指導をいただき感謝致します。ヒトデの採集に協力していただいた慶應義塾大学文学部人文社会学科倉石立准教授、浅虫海洋生物学教育研究センターの技術職員の鷺尾正彦さんと阿部宏和さんに感謝致します。研究、生活面で支えていただいた東北大学大学院生命科学研究科附属浅虫海洋生物学教育研究センターの皆様に感謝いたします。研究生活を過ごすにあたり経済的な支援とご理解をいただいた両親、家族に深く感謝いたします。

## 参考文献

- Aarhus, R. Graeff, R. M. Dickey, D. M. Walseth, T. F. Lee, H. C. 1995. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calciummobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem.* 270, 30327-30333.
- Billington, R. A. Ho, A. Genazzani, A. A. 2002. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) is present at micromolar concentrations in sea urchin spermatozoa. *J Physiol.* 544, 107-112.
- Buraei, Z. Lee, H. K. Elmslie, K. S. 2015. Single channel measurements demonstrate the voltage dependence of permeation through N-type and L-type CaV channels. *Channels (Austin).* 9, 50-55.
- Carroll, D. J. Ramarao, C. S. Mehlmann, L. M. Roche, S. Terasaki, M. Jaffe, L. A. 1997. Calcium release at fertilization in starfish eggs is mediated by phospholipase Cgamma. *J. Cell Biol.* 138, 1303-1311.
- Carroll, D. J. Albay, D. T. Terasaki, M. Jaffe, L. A. Foltz, K. R. 1999. Identification of PLCgamma-dependent and -independent events during fertilization of sea urchin eggs. *Dev. Biol.* 206, 232-247.
- Chiba, K. Kado, R. T. Jaffe, L. A. 1990. Development of calcium release mechanisms during starfish oocyte maturation. *Dev. Biol.* 140, 300-306.

- Chini, E. N. Beers, K. W. Dousa, T. P. 1995. Nicotinate adenine dinucleotide phosphate (NAADP) triggers a specific calcium release system in sea urchin eggs. *J Biol Chem.* 270, 3216-3223.
- Churchill, G. C. Okada, Y. Thomas, J. M. Genazzani, A.A. Patel, S. Galione, A. 2002. NAADP mobilizes  $\text{Ca}^{2+}$  from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell.* 111, 703-708.
- Churchill, G.C., J.S. O'Neil, R. Masgrau, S. Patel, J.M. Thomas, A.A. Genazzani, and A. Galione. 2003. Sperm deliver a new messenger: NAADP. *Curr. Biol.* 13, 125-128.
- Dale, B. 2014. Is the idea of a fast block to polyspermy based on artifact? *Biochem Biophys Res Commun.* 450, 1159-1165.
- Davis, L. C. Morgan, A.J. Ruas, M. Wong, J. L. Graeff, R. M. Poustka, A. J, Lee, H. C. Wessel, G. M. Parrington, J. Galione, A. 2008.  $\text{Ca}^{2+}$  signaling occurs via second messenger release from intraorganelle synthesis sites. *Curr Biol.* 18. 1612-1618.
- Fujiwara, A. Taguchi, K. Yasumasu, I. 1990 Fertilization membrane formation in sea urchin eggs induced by drugs known to cause  $\text{Ca}^{2+}$  release from isolated sarcoplasmic reticulum. *Dev. Growth Differ.* 32, 303-314.

- Gardner, A. J. and Evans, J. P. 2006. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reprod Fertil Dev* 18, 53-61.
- Gould, M.C. Stephano, J.L. 2003. Polyspermy prevention in marine invertebrates. *Microsc Res Tech*. 61, 379-388.
- Graeff, R. M. Franco, L. De Flora, A. Lee, H. C. 1998. Cyclic GMP-dependent and -independent effects on the synthesis of the calcium messengers cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 118–125.
- Graeff, R. Liu, Q. Kriksunov, I. A. Hao, Q. Lee, H. C. 2006. Acidic residues at the active sites of CD38 and ADP-ribosyl cyclase determine nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) synthesis and hydrolysis activities. *J Biol Chem*. 281, 28951-28957
- Guerrier, P. and Doree, M. 1975. Hormonal control of reinitiation of meiosis in starfish. The requirement of 1-methyladenine during nuclear maturation. *Dev Biol*. 47. 341-348
- Harada, K. Oita E, Chiba K. 2003. Metaphase I arrest of starfish oocytes induced via the MAP kinase pathway is released by an increase of intracellular pH. *Development*. 130, 4581-4586.



- Hartzell, H. C. Machaca, K. Hirayama, Y. 1997. Effects of adenophostin-A and inositol-1,4,5-trisphosphate on Cl<sup>-</sup> currents in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Pharmacol.* 51, 683-692.
- Hirohashi, N., Harada, K., Chiba, K.. 2008. Hormone-induced cortical maturation ensures the slow block to polyspermy and does not couple with meiotic maturation in starfish. *Dev Biol.* 318, 194-202.
- Iwasaki, H. Chiba, K. Uchiyama, T. Yoshikawa, F. Suzuki, F. Ikeda, M. Furuichi, T. Mikoshiba, K. 2002. Molecular characterization of the starfish inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and its role during oocyte maturation and fertilization. *J Biol Chem.* 277, 2763-2772.
- Jadot, M. Colmant, C. Wattiaux-De, Coninck. S. Wattiaux, R. 1984. Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide. *Biochem J.* 219, 965-970.
- Jaffe, L. A. 1976. Fast block to polyspermy in sea urchin eggs is electrically mediated. *Nature.* 1976. 261. 68-71.
- Kanatani, H. 1973. Maturation-inducing substance in starfishes. *Int Rev Cytol.* 35.,253-298.

- Kumano, M. Carroll, D. J. Denu, J. M. Foltz, K. R. 2001. Calcium-mediated inactivation of the MAP kinase pathway in sea urchin eggs at fertilization. *Dev Biol.* 236, 244-257.
- Kuroda, R. Kontani, K. Kanda, Y. Katada, T. Nakano, T. Satoh, Y. Suzuki, N. Kuroda, H. 2001. Increase of cGMP, cADP-ribose and inositol 1,4,5-trisphosphate preceding  $\text{Ca}^{2+}$  transients in fertilization of sea urchin eggs. *Development.* 128, 4405-4414.
- Kyozuka, K. Chun, J.T. Puppo, A. Gagnaniello, G. Garante, E. Santella, L. 2008. Actin cytoskeleton modulates calcium signaling during maturation of starfish oocytes. *Dev Biol.* 320, 426-435.
- Lange, K. 1999. Microvillar  $\text{Ca}^{++}$  signaling: a new view of an old problem. *J Cell Physiol.* 180, 19-34.
- Lange, K., Gartzke, J., 2006. F-actin-based Ca signaling-a critical comparison with the current concept of Ca signaling. *J. Cell. Physiol.* 209, 270-287.
- Lee, H.C. Walseth, T. F. Bratt, G. T. Hayes, R. N. Clapper, D. L.. 1989. Structural determination of a cyclic metabolite of  $\text{NAD}^+$  with intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing activity. *J Biol Chem.* 264, 1608-1615.
- Lee, H. C. and Aarhus, R. 1991. ADP-ribosyl cyclase: an enzyme that cyclizes  $\text{NAD}^+$  into a calcium-mobilizing metabolite. *Cell Regul.* 2, 203-209.

- Lee, H. C. Aarhus, R. Walseth, T. F. 1993. Calcium mobilization by dual receptors during fertilization of sea urchin eggs. *Science*. 261, 352-535.
- Lim, D. Kyojuka, K. Gragnaniello, G. Carafoli, E. Santella, L. 2001. NAADP+ initiates the  $\text{Ca}^{2+}$  response during fertilization of starfish oocytes. *FASEB J.* 15, 2257-2267.
- Lim, D. Lange, K. Santella, L. 2002. Activation of oocytes by latrunculin A. *FASEB J.* 16, 1050-1056.
- Lim, D. Ercolano, E. Kyojuka, K. Nusco, G. A. Moccia, F. Lange, K. Santella, L. 2003. The M-phase-promoting factor modulates the sensitivity of the  $\text{Ca}^{2+}$  stores to inositol 1,4,5-trisphosphate via the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 278, 42505-42514.
- Markoulaki, S. Matson, S. Abbott, A. L. Ducibella, T. 2003. Oscillatory CaMKII activity in mouse egg activation. *Dev Biol.* 258, 464-474.
- Miyazaki, S. and Hirai, S. 1979. Fast polyspermy block and activation potential. Correlated changes during oocyte maturation of a starfish. *Dev Biol.* 70, 327-340.
- Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K. Honda, Y. 1993a. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ $\text{Ca}^{2+}$  release channel in  $\text{Ca}^{2+}$  waves and  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev. Biol.* 158. 62-78.

- Miyazaki S, Yuzaki M, Nakada K, Shirakawa H, Nakanishi S, Nakade S, Mikoshiba K. 1993b. Block of  $\text{Ca}^{2+}$  wave and  $\text{Ca}^{2+}$  oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*. 257. 251-255.
- Miyazaki, S. 2006. Thirty years of calcium signals at fertilization. *Dev. Biol.* 17. 233-243.
- Moccia, F. Lim, D. Kyojuka, K. Santella, L. 2004. NAADP triggers the fertilization potential in starfish oocytes. *Cell Calcium*. 36, 515-524.
- Moreschi, I. Bruzzone, S. Melone, L. De Flora, A. Zocchi, E. 2006. NAADP<sup>+</sup> synthesis from cADPRP and nicotinic acid by ADP-ribosyl cyclases. *Biochem Biophys Res Commun*. 345, 573-580.
- Morla, A. Draetta, G. Beach, D. Wang, J.Y. 1989. Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. *Cell*. 58, 193-203.
- Nilsson, T. Zwiller, J. Boynton, A.L. Berggren, P.O. 1988. Heparin inhibits IP<sub>3</sub>-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release in permeabilized pancreatic beta-cells. *FEBS Lett*. 229, 211-214.
- Nusco, G. A. Lim, D. Sabala, P. Santella, L. 2002.  $\text{Ca}^{2+}$  response to cADPr during maturation and fertilization of starfish oocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 290, 1015-1021.

- Perez-Reyes, E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev.* 83, 117-161.
- Rakow, T. L. Shen, S. S. 1990. Multiple stores of calcium are released in the sea urchin egg during fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 9285-9289.
- Ramos, I. and Wessel, G. M. 2013. Calcium pathway machinery at fertilization in echinoderms. *Cell Calcium.* 53, 16-23.
- Reimann, J. D. Jackson, P. K. 2002. Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature.* 416, 850-854.
- Runft, L. L. Jaffe, L. A. Mehlmann, L. M. 2002. Egg activation at fertilization: where it all begins. *Dev Biol.* 245, 237-254.
- Rusinko, N. and Lee, H. C. 1989. Widespread occurrence in animal tissues of an enzyme catalyzing the conversion of NAD<sup>+</sup> into a cyclic metabolite with intracellular Ca<sup>2+</sup>-mobilizing activity. *J Biol Chem.* 264, 11725-11731.
- Santella, L. Kyozuka, K. 1994. Reinitiation of meiosis in starfish oocytes requires an increase in nuclear Ca<sup>2+</sup>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 674-680.

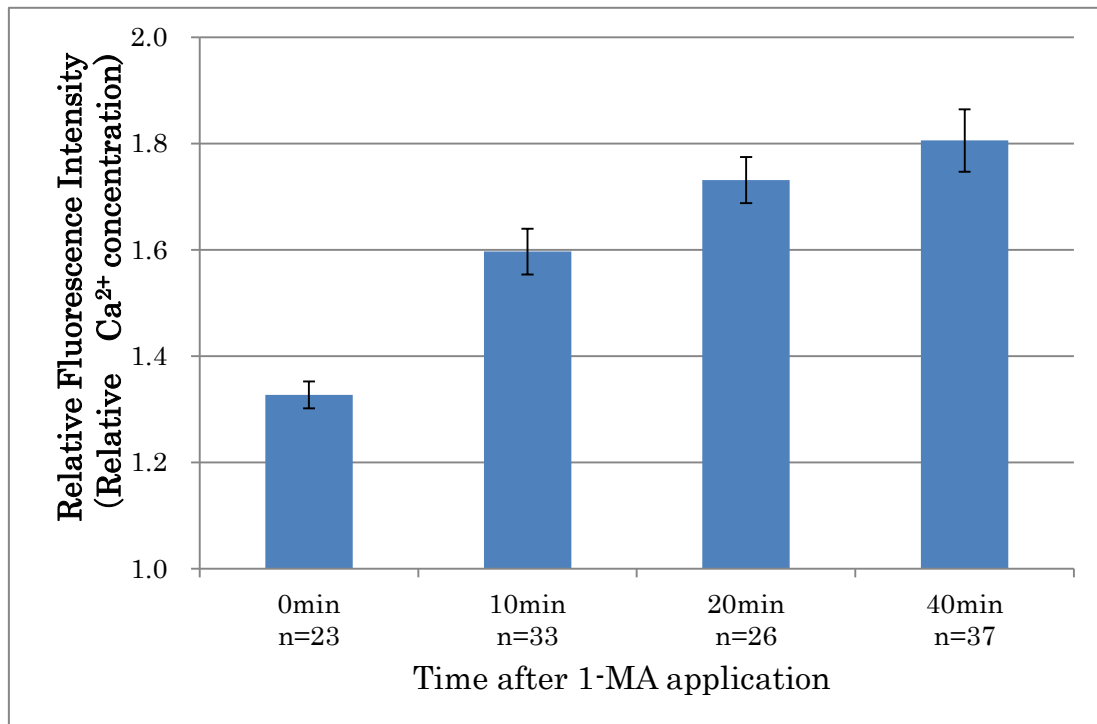
- Santella, L. Kyojuka, K. Genazzani, A. A. De Riso, L. Carafoli, E. 2000. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-induced  $\text{Ca}^{(2+)}$  release. Interactions among distinct  $\text{Ca}^{(2+)}$  mobilizing mechanisms in starfish oocytes. *J Biol Chem.* 275, 8301-8306.
- Santella, L. and Chun, J. T. 2011. Actin, more than just a housekeeping protein at the scene of fertilization. *Sci China Life Sci.* 54, 733-743.
- Santella, L., Vasilev, F., Chun, J. T. 2012. Fertilization in echinoderms. *Biochem Biophys Res Commun.* 425, 588-594.
- Saunders, C. M. Larman, M. G. Parrington, J. Cox, L. J. Royse, J. Blayney, L. M. Swann, K. Lai, F. A. 2002. PLC  $\zeta$  : a sperm-specific trigger of  $\text{Ca}^{(2+)}$  oscillations in eggs and embryo development. *Development.* 129,3533-3544.
- Schmidt, T. Patton, C. Epel, D. 1982. Is there a role for the  $\text{Ca}^{2+}$  influx during fertilization of the sea urchin egg? *Dev Biol.* 90, 284-290.
- Schroeder, T.E., Stricker, S.A., 1983. Morphological changes during maturation of starfish oocytes: surface ultrastructure and cortical actin. *Dev. Biol.* 98, 373–384.
- Shen, S. S. and Buck, W. R. 1993. Sources of calcium in sea urchin eggs during the fertilization response. *Dev Biol.* 157, 157-169.

- Song, T., Hao, Q.L., Zheng, Y.M., Liu, Q.H., Wang, Y.X. 2015. Inositol 1,4,5-trisphosphate activates TRPC3 channels to cause extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 309, L1455-L1466.
- Steinhardt, R. A. Lundin, L. Mazia, D. 1971. Bioelectric responses of the echinoderm egg to fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68, 2426-2430.
- Stricker, S. A. 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Dev. Biol.* 211. 157-176.
- Swann, K. and Whitaker, M. 1986. The part played by inositol trisphosphate and calcium in the propagation of the fertilization wave in sea urchin eggs. *J Cell Biol.* 103, 2333-2342.
- Tsaadon, A. Eliyahu, E. Shtraizent, N. Shalgi, R. 2006. When a sperm meets an egg: block to polyspermy. *Mol Cell Endocrinol.* 252,107-114.
- Washitani-Nemoto, S., Saitoh, C., Nemoto, S. 1994. Artificial parthenogenesis in starfish eggs: behavior of nuclei and chromosomes resulting in tetraploidy of parthenogenotes produced by the suppression of polar body extrusion. *Dev Biol.* 163, 293-301.
- Whitaker, M. 2006. Calcium at Fertilization and in Early Development. *Physiol Rev.* 86. 25-88.

- Wilson, H. L. and Galione, A. 1998. Differential regulation of nicotinic acid–adenine dinucleotide phosphate and cADP-ribose production by cAMP and cGMP. *Biochem. J.* 331, 837–843.
- Yoshida, M. Sensui, N. Inoue, T. Morisawa, M. Mikoshiba, K. 1998. Role of two series of  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in activation of ascidian eggs. *Dev Biol.* 203, 122-133.
- Zhang, F. and Li, P. L. 2007. Reconstitution and characterization of a nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  release channel from liver lysosomes of rats. *J Biol Chem.* 282, 25259-25269.
- Zielinska, W. Barata, H. Chini, E. N. 2004. Metabolism of cyclic ADP-ribose: zinc is an endogenous modulator of the cyclase/NAD glycohydrolase ratio of a CD38-like enzyme from human seminal fluid. *Life Sci.* 74, 1781–1790.



a



b

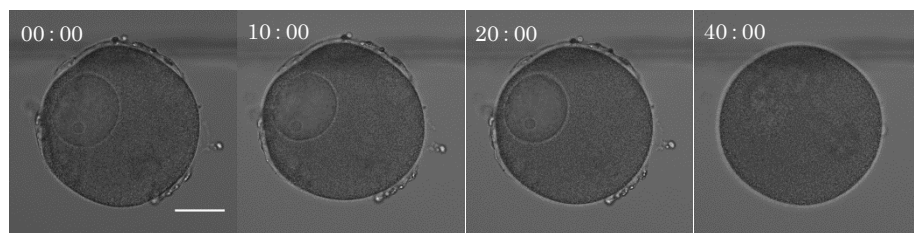


図 1 各卵成熟ステージにおける卵母細胞への媒精後の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値

a : 横軸は 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵へ媒精した時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、媒精前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。b : 図 a 横軸の各時間に対応した卵母細胞の卵成熟の進行状態。右上は 1-MA 添加後の時間 (分 : 秒)、白線は 50  $\mu\text{m}$  を示す。

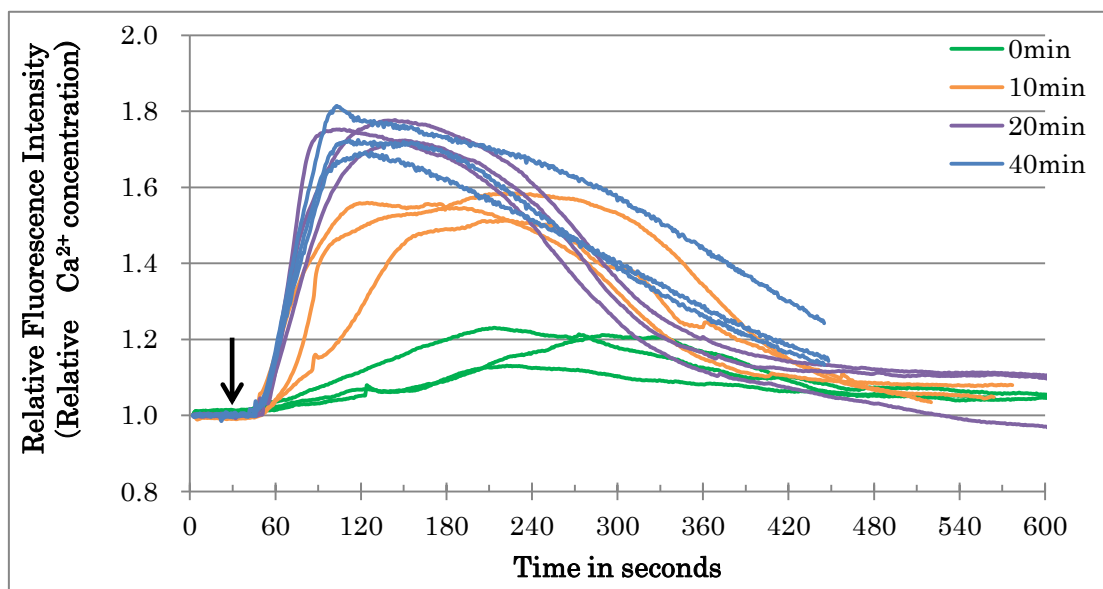


図 2 各卵成熟ステージにおける卵母細胞への媒精後の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  変化

横軸は時間 (second)、矢印は精子を加えた時間を示す(30 sec)。縦軸はそれぞれの卵へ媒精した時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、媒精前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した。1-MA 添加前 (0 分、緑色)、添加後 10 分 (橙色)、20 分 (紫色)、40 分卵 (青色) へ媒精した時の  $\text{Ca}^{2+}$  変化を各々 3 例ずつ示した。

表 1 各卵成熟ステージにおける卵母細胞への媒精後の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の  $\text{Ca}^{2+}$  ピークまでに要する時間

	時間(秒)
0min	216.74 ± 14.63
10min	135.26 ± 7.43
20min	84.90 ± 8.54
40min	64.23 ± 4.69

$\text{Ca}^{2+}$  ピーク値の 10% から、 $\text{Ca}^{2+}$  ピーク値 (100%) までに要する時間を計測した。平均値 ± 標準誤差をそれぞれ 6 例から算出した。

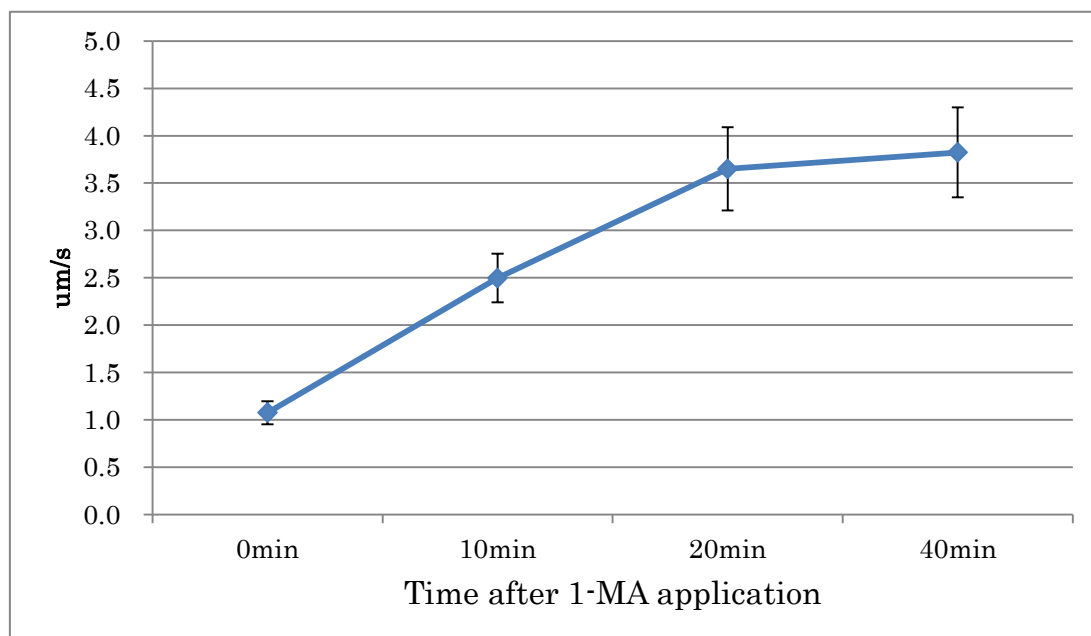


図 3 各卵成熟ステージにおける卵母細胞への媒精後の  $\text{Ca}^{2+}$ 伝播速度

横軸は 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵へ媒精した時の  $\text{Ca}^{2+}$  wave の伝播速度を、 $\text{Ca}^{2+}$ 上昇ピーク値に至る途中の相対的上昇値が 10% に達した点を起点として、90%に至るまでの時間で卵直径  $160\mu\text{m}$  を割った  $\text{Ca}^{2+}$  wave の伝播速度 ( $\mu\text{m/s}$ ) (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。例数はそれぞれ 7 例から算出した。

表 2 各卵成熟ステージにおける卵母細胞への媒精後の  $\text{Ca}^{2+}$ 伝播速度

	速さ( $\mu\text{m/s}$ )
0min	$1.07 \pm 0.12$
10min	$2.50 \pm 0.26$
20min	$3.65 \pm 0.44$
40min	$3.82 \pm 0.47$

図 3 を表とした。平均値±標準誤差 をそれぞれ 7 例から算出した。

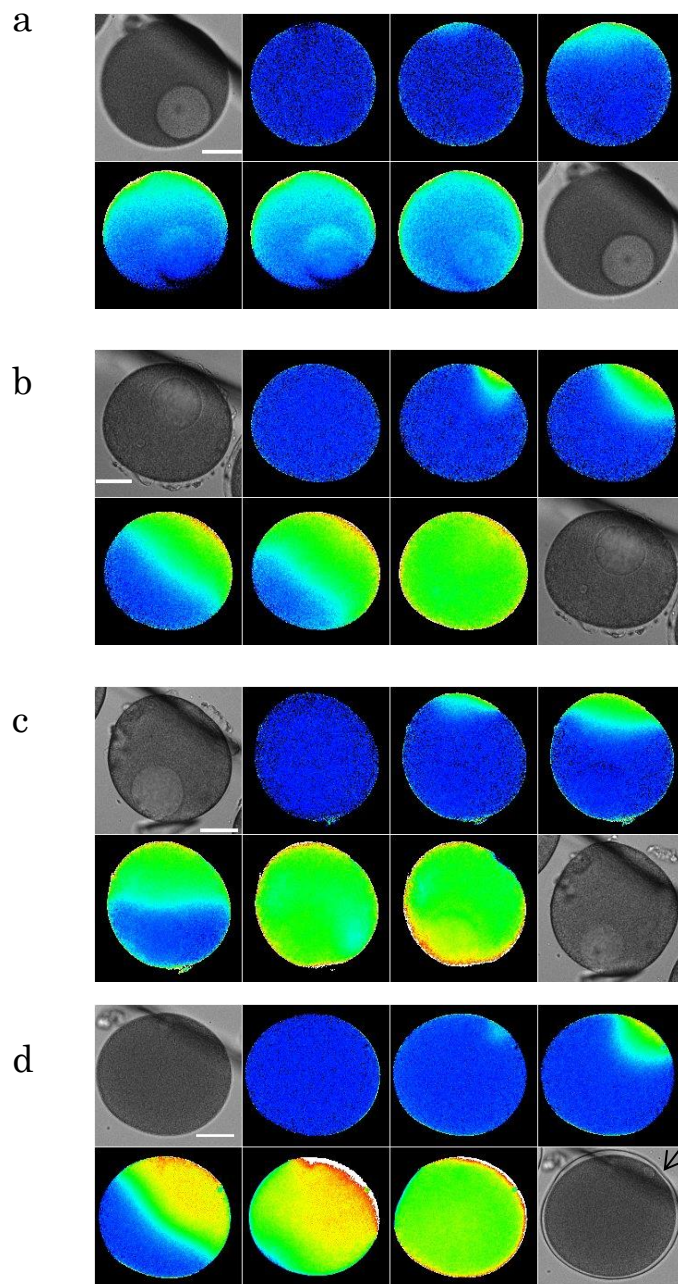


図4 各卵成熟ステージにおける卵母細胞への媒精後の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  時空間変化

卵巣から切り出された未成熟卵母細胞 (a)、1-MA 添加後 10 分 (b)、20 分 (c)、40 分 (d) に媒精した時の  $\text{Ca}^{2+}$  変化を 1 秒毎に経時的に観察した。透過像はそれぞれ卵成熟ステージにおける媒精前と媒精後。矢印 (黒) は受精膜を示す。bar は  $50\ \mu\text{m}$  を示す。

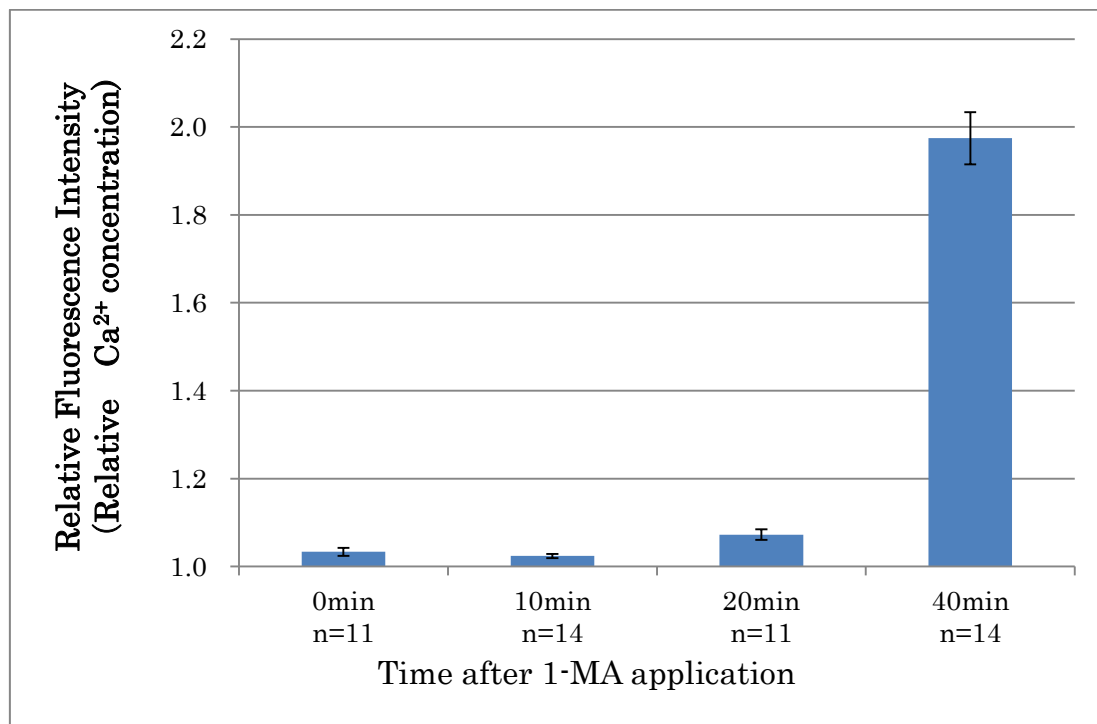


図 5 各卵成熟ステージにおける卵母細胞の IP<sub>3</sub> 依存性 Ca<sup>2+</sup>遊離機構

卵巣から切り出された未成熟卵母細胞に 5  $\mu$ M caged IP<sub>3</sub> を顕微注射し、1-MA 添加前 (0 分)、及び添加後 10 分、20 分、40 分の卵母細胞に紫外線を 30 秒間照射し、IP<sub>3</sub> を活性化した。横軸は 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵母細胞を紫外線照射により活性化 (uncaging) した時の卵内 Ca<sup>2+</sup> 上昇ピーク値を uncaging 前の蛍光値 (Ca<sup>2+</sup> 濃度) を「1」とした時の相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

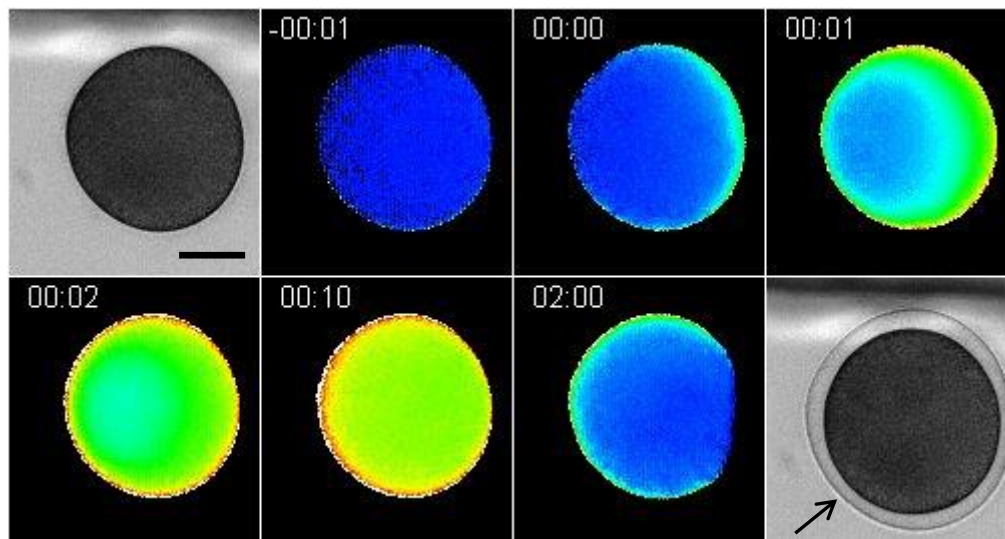


図 6 成熟卵（1-MA 添加 40 分）における  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離反応の時空間変化

卵巣から切り出した卵母細胞に  $5 \mu\text{M}$  caged  $\text{IP}_3$  を顕微注射し、1-MA 添加後 40 分の成熟卵に紫外線を 30 秒間照射し、 $\text{IP}_3$  を活性化した時の  $\text{Ca}^{2+}$  変化を 1 秒毎に経時的に観察した。左上は紫外線照射開始時を 0 秒とした経過時間（分：秒）透過像は媒精前と媒精後。矢印（黒）は受精膜を示す。bar は  $50 \mu\text{m}$  を示す。

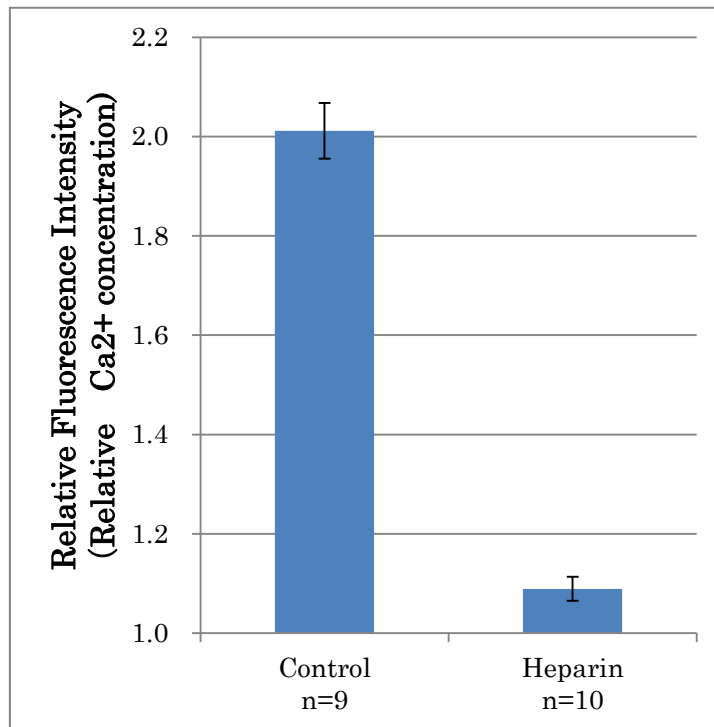


図 7 Heparin を顕微注射した成熟卵における IP<sub>3</sub> 依存性 Ca<sup>2+</sup>反応

横軸は、10 mg/ml Heparin と 5  $\mu$ M caged IP<sub>3</sub>を未成熟卵に顕微注射し、1-MA 添加 40 分の成熟卵に紫外線を 30 秒間照射した (Heparin)。コントロールとして成熟卵に 5  $\mu$ M caged IP<sub>3</sub>を顕微注射した。縦軸はそれぞれの成熟卵を uncaging した時の卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇ピーク値を uncaging 前の蛍光値 (Ca<sup>2+</sup>濃度)を「1」とした時の相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

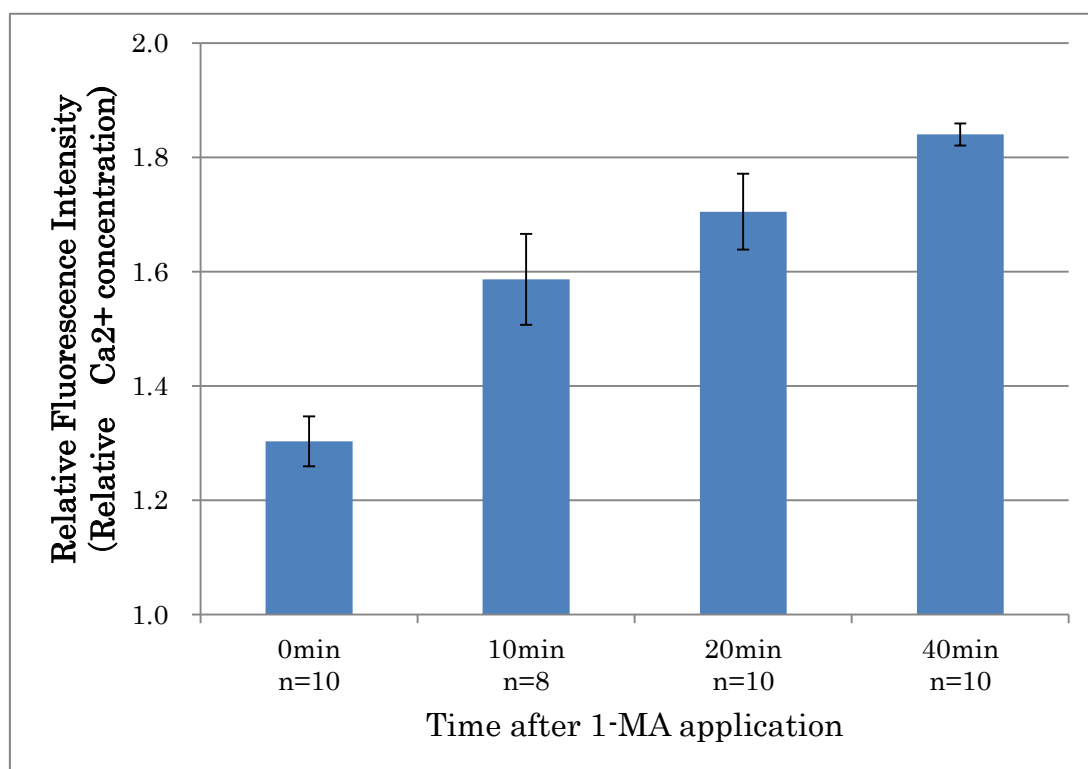


図 8 Heparin を顕微注射した各卵成熟ステージの卵母細胞における媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値

横軸は 10 mg/ml の Heparin を未成熟卵母細胞に顕微注射し 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵へ媒精した時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を媒精前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。



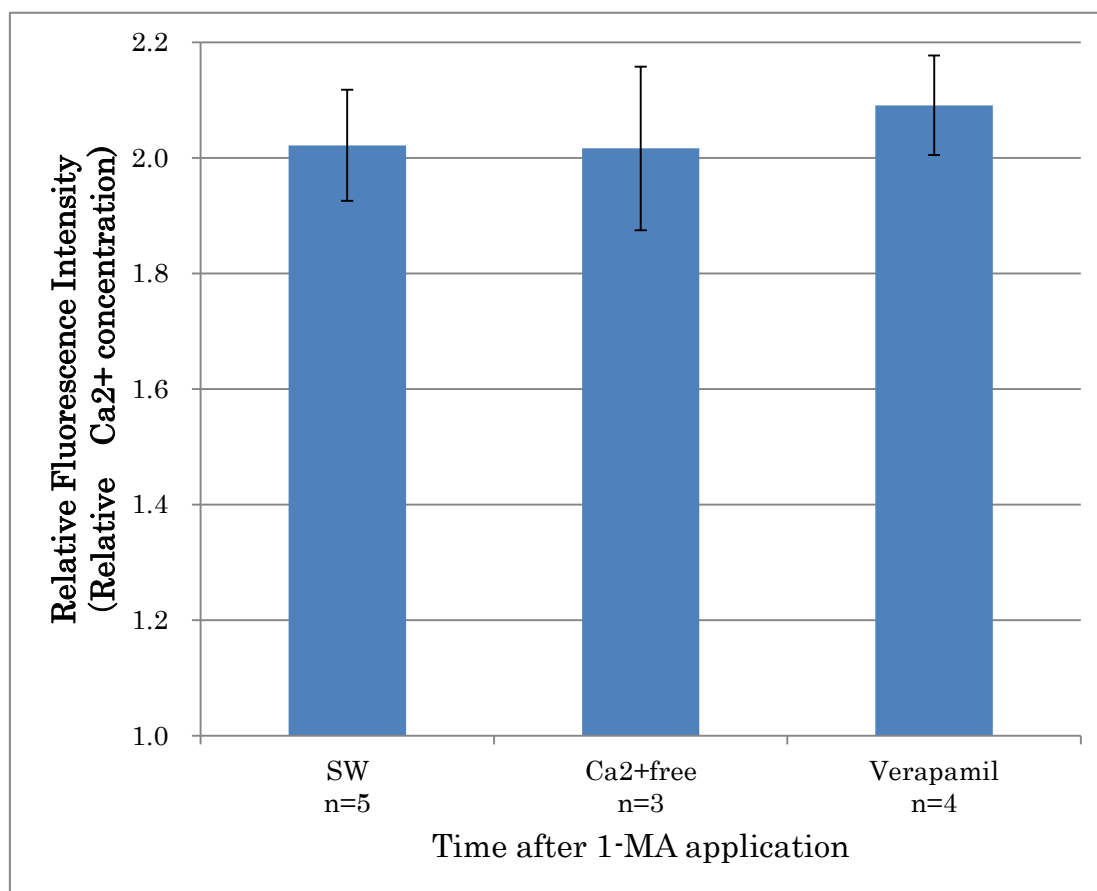


図 9 Verapamil 存在下における成熟卵の IP<sub>3</sub> 依存性 Ca<sup>2+</sup> 反応

横軸は 5  $\mu$ M caged IP<sub>3</sub> を未成熟卵に顕微注射し、1-MA 添加 40 分の成熟卵を海水中 (SW)、Ca<sup>2+</sup> 欠如海水中 (Ca<sup>2+</sup> free)、及び 100 $\mu$ M verapamil 海水中 (Verapamil) に 10 分間インキュベートした後、30 秒間紫外線を照射した。縦軸はそれぞれの成熟卵に紫外線を 30 秒間照射した時の Ca<sup>2+</sup> 上昇ピーク値を uncaging 前の蛍光値 (Ca<sup>2+</sup> 濃度) を「1」とした時の相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

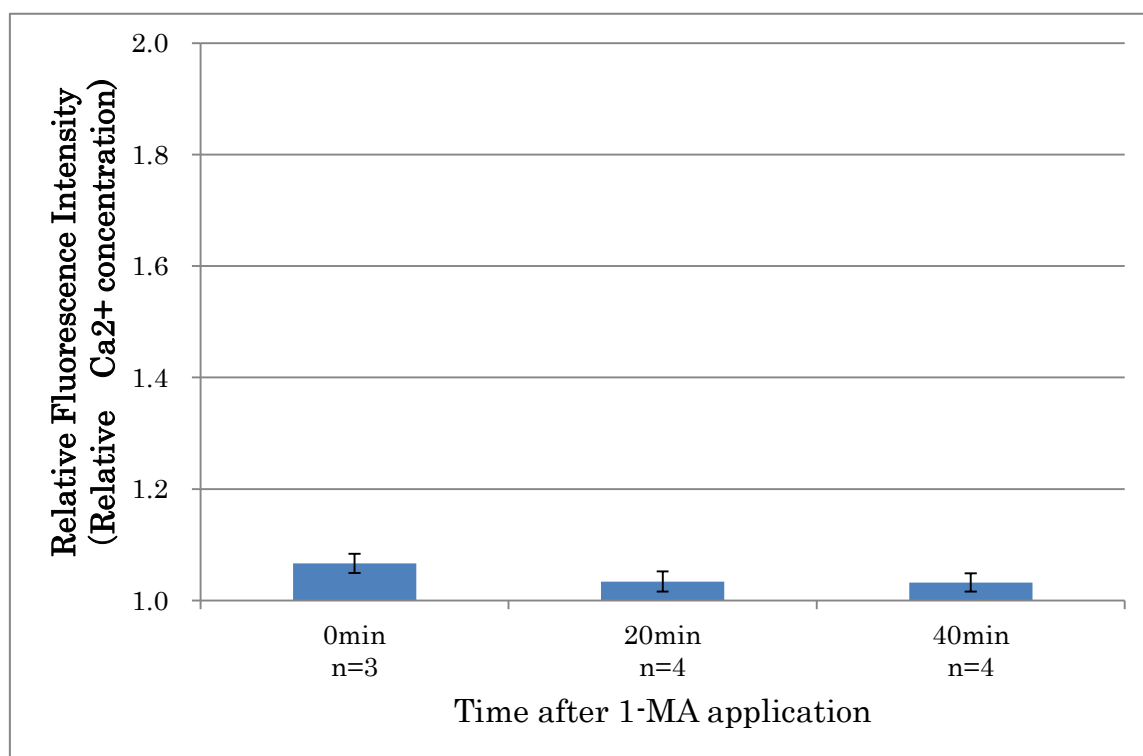


図 10 各卵成熟ステージの卵母細胞における cADPR 顕微注射時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇反応

1-MA 添加前 (0 分)、添加後 20 分、40 分の卵母細胞に 1 mM cADPR を顕微注射した。横軸は 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵へ cADPR を顕微注射した時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、媒精前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

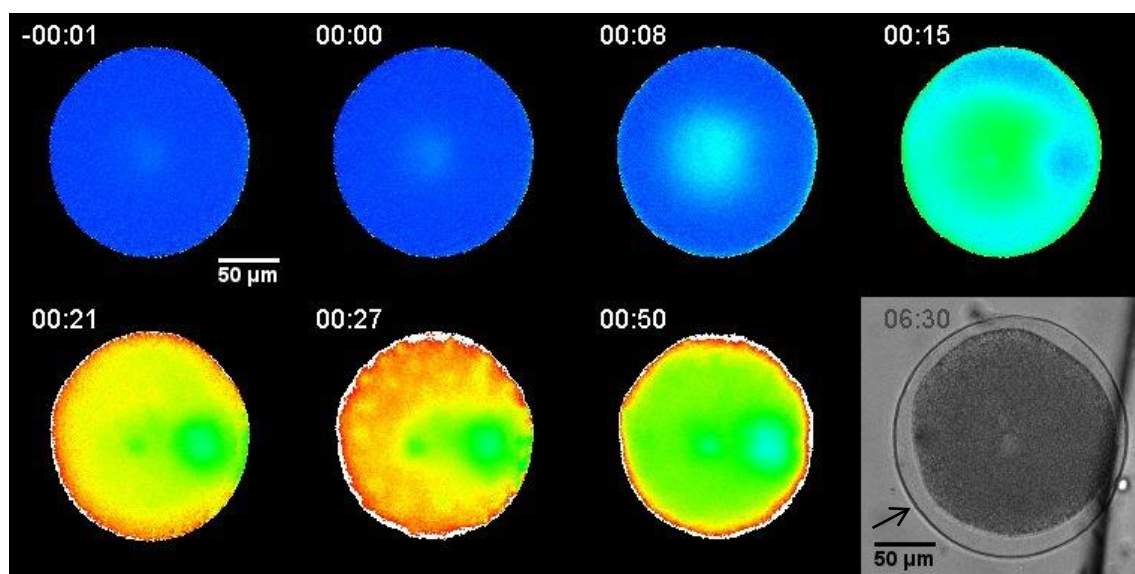


図 11 成熟卵（1・MA 添加 40 分）における NAADP 顕微注射時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の時空間変化

成熟卵（1・MA 添加後 40 分）に  $100 \mu\text{M}$  NAADP を顕微注射し、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を 1 秒間隔で経時的に計測した。右上は顕微注射開始時を 0 とした時の経過時間（分：秒）透過像は顕微注射後。矢印（黒）は受精膜を示す。bar は  $50 \mu\text{m}$  を示す。

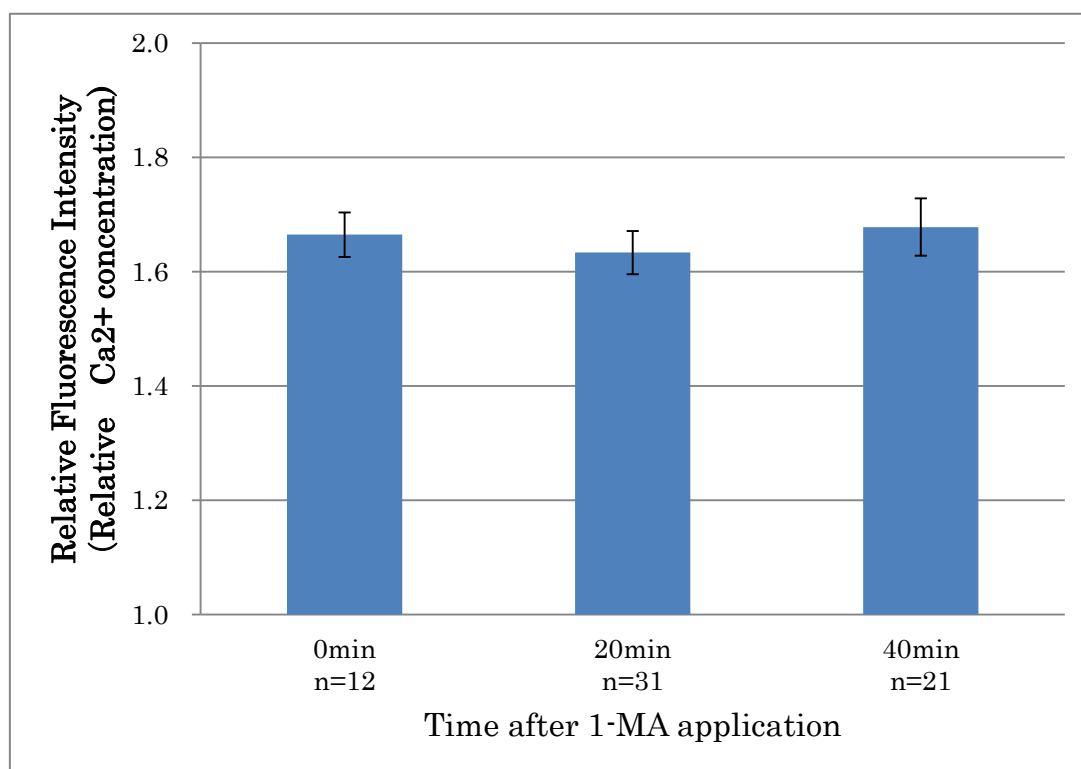


図 12 各卵成熟ステージの卵母細胞における NAADP 顕微注射時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇反応

1-MA 添加前 (0 分)、添加後 20 分、40 分の卵母細胞に 100  $\mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した。

横軸は 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵へ NAADP を顕微注射した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、媒精前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

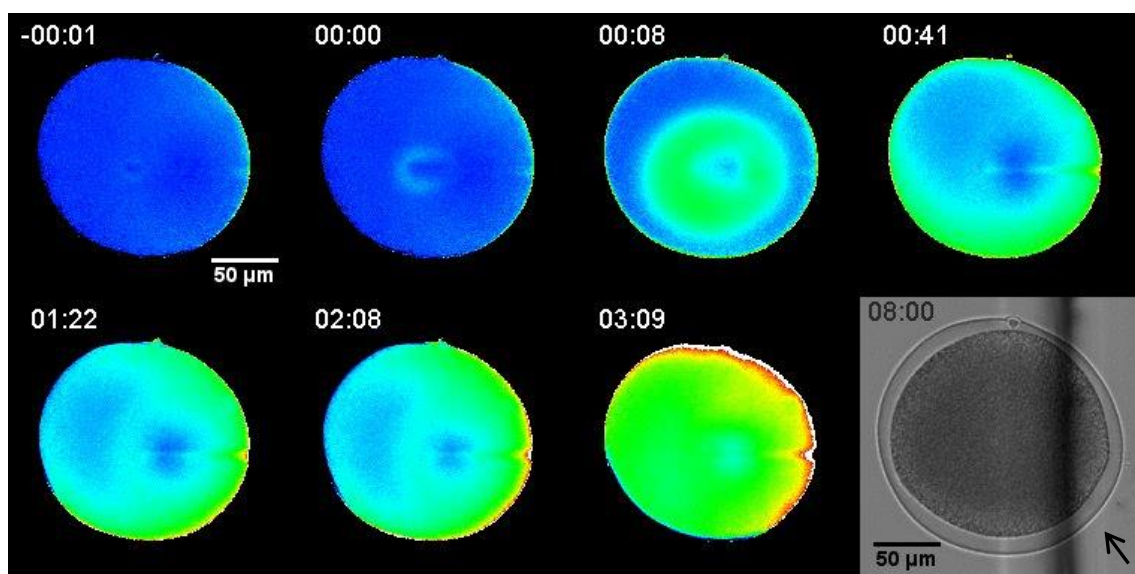


図 13 成熟卵（1-MA 添加 40 分）における NADP 顕微注射時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の時空間変化

1-MA 添加後 40 分の成熟卵に 5 mM NADP を顕微注射し、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  変化を 1 秒間隔で経時的に観察した。左上は顕微注射開始時を 0 とした経過時間（分：秒）透過像は顕微注射後。矢印（黒）は受精膜を示す。bar はそれぞれ 50  $\mu\text{m}$  を示す。

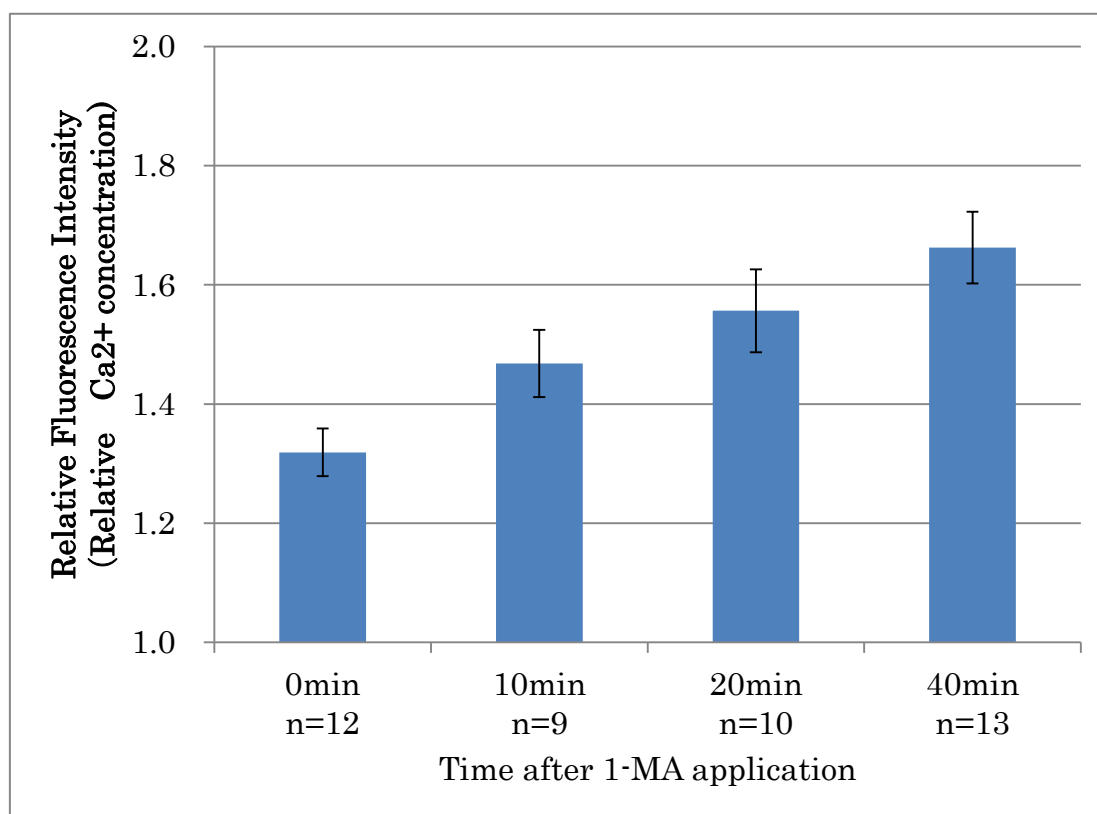


図 14 各卵成熟ステージにおける卵母細胞の NADP 顕微注射時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇

1-MA 添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分の卵母細胞に 5 mM NADP を顕微注射した。横軸は 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵へ NADP を顕微注射した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、媒精前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

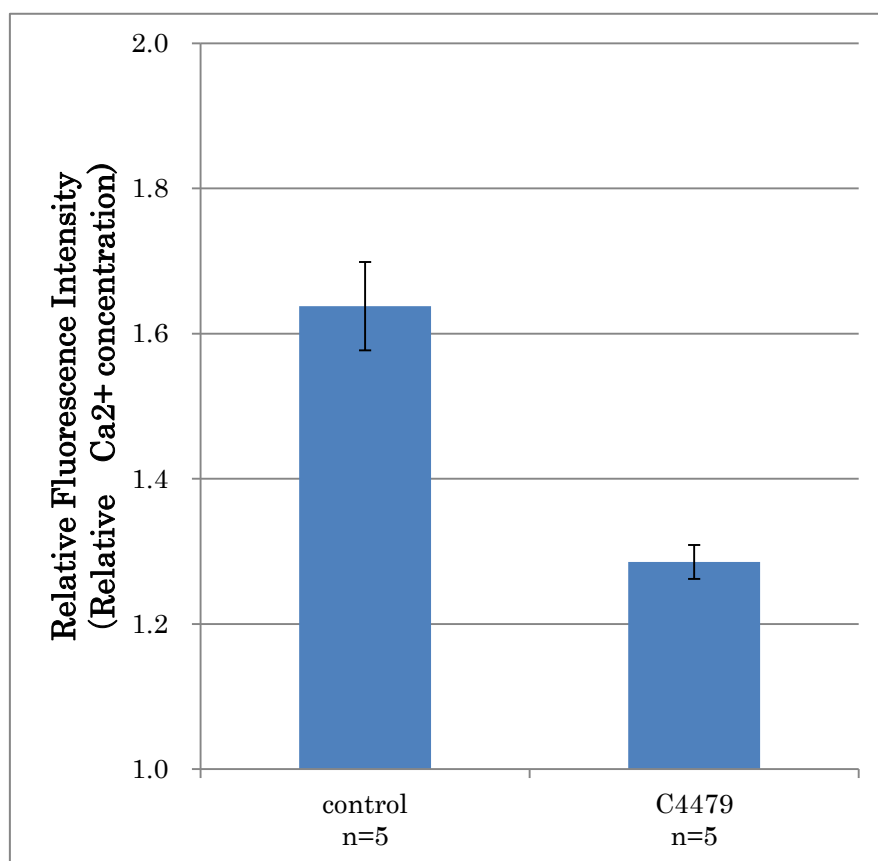


図 15 卵成熟途上卵 (1-MA 添加 20 分) における NADP 顕微注射時の C4479 の効果

横軸は、未成熟卵母細胞に 0.2 mM C4479 を顕微注射し、卵成熟途上卵 (1-MA 添加 20 分) に 5 mM の NADP を顕微注射した (C4479)。コントロールは、C4479 を顕微注射していない卵成熟途上卵を用いた (control)。縦軸はそれぞれの卵へ NADP を顕微注射した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、顕微注射前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

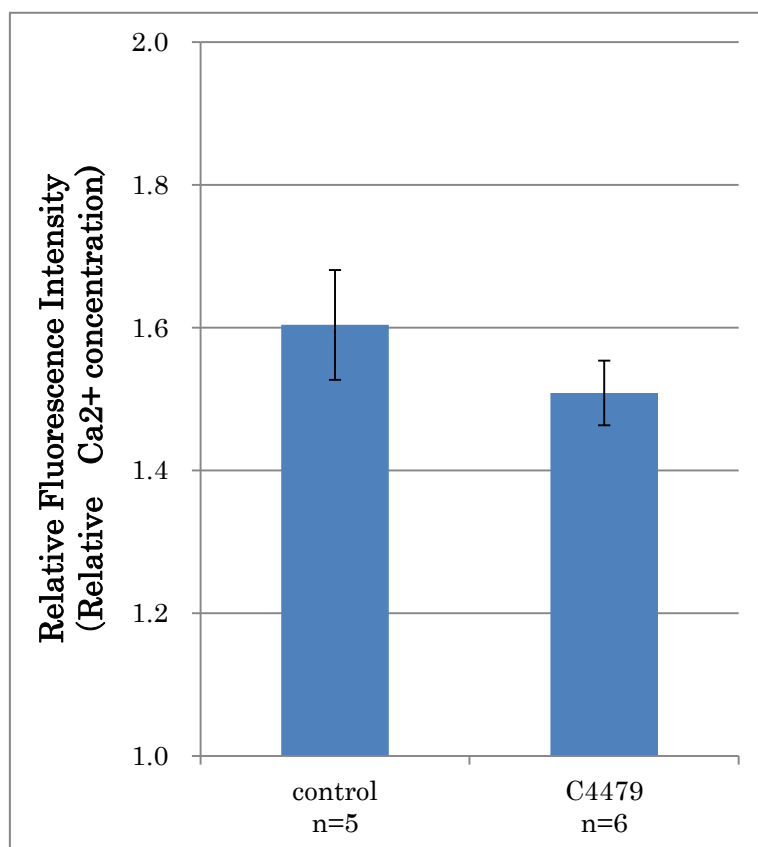


図 16 卵成熟途上卵（1-MA 添加 20 分）における NAADP 顕微注射時の C4479 の効果

横軸は、未成熟卵母細胞に 0.2 mM C4479 を顕微注射し、卵成熟途上卵（1-MA 添加 20 分後）に 100  $\mu$ M NAADP を顕微注射した（C4479）。コントロールは C4479 を顕微注射していない卵成熟途上卵を用いた（control）。縦軸はそれぞれの卵へ NAADP を顕微注射した時の卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇ピーク値を、NAADP 顕微注射前の蛍光値（Ca<sup>2+</sup>濃度）を「1」としたときの相対値で示した（グラフ上の各 bar は標準誤差を示す）。n は測定卵数を示す。



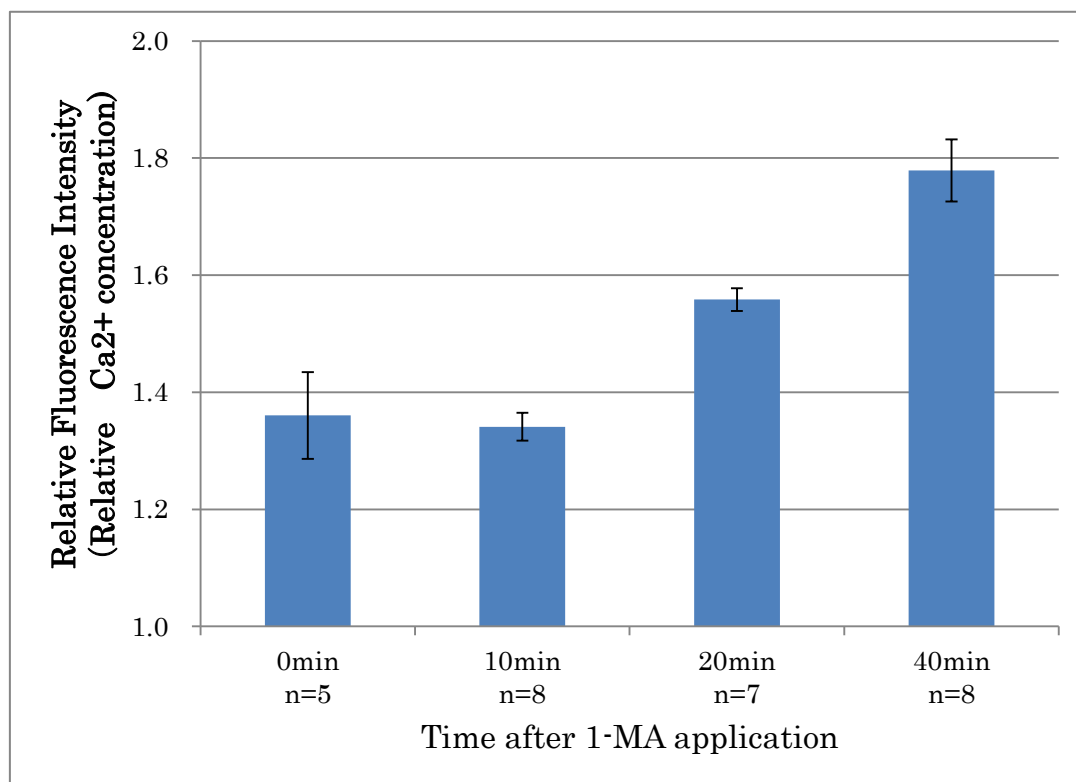


図 17 各卵成熟ステージにおける C4479 顕微注射卵母細胞の媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値

横軸は未成熟卵母細胞に 0.2mM C4479 を顕微注射した後、1-MA 添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分の卵、縦軸はそれぞれの卵へ媒精した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、媒精前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

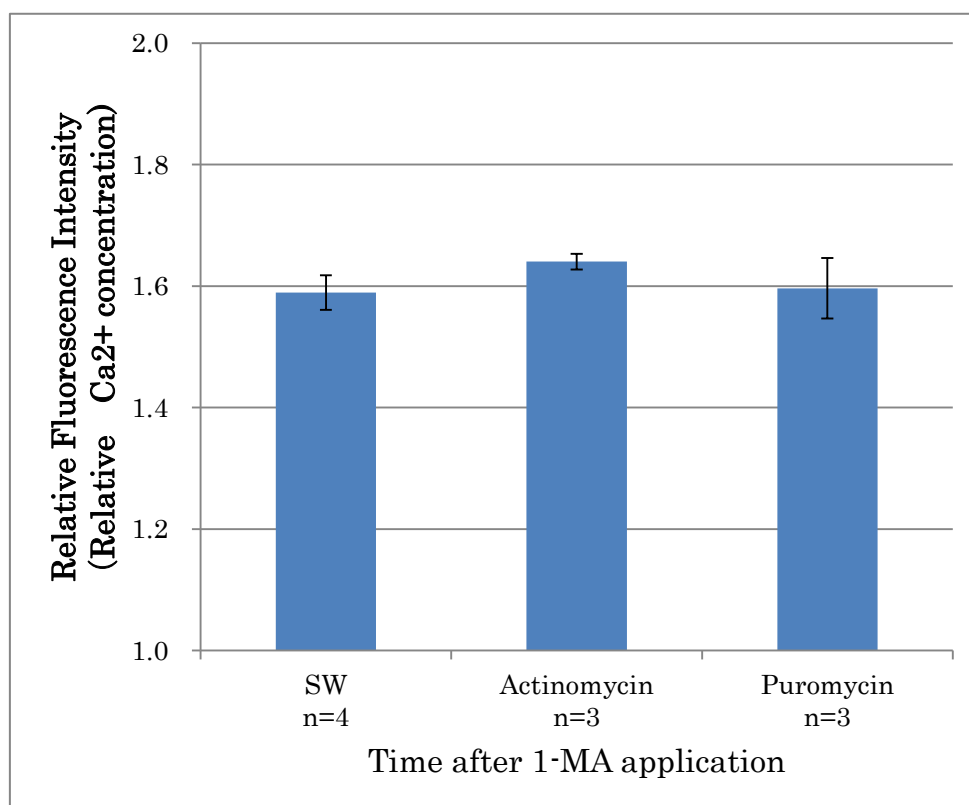


図 18 Actinomycin D 及び Puromycin 存在下の成熟卵における NADP 顕微注射時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇

横軸は、未成熟卵母細胞を 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Actinomycin D (Actinomycin)、または 0.5 mM Puromycin (Puromycin) 存在下で 1-MA による卵成熟を進行させ、成熟卵 (1-MA 添加 40 分) を得た。コントロール は海水中で卵成熟を進行した (SW)。縦軸はそれぞれの卵へ NADP を顕微注射した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、媒精前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

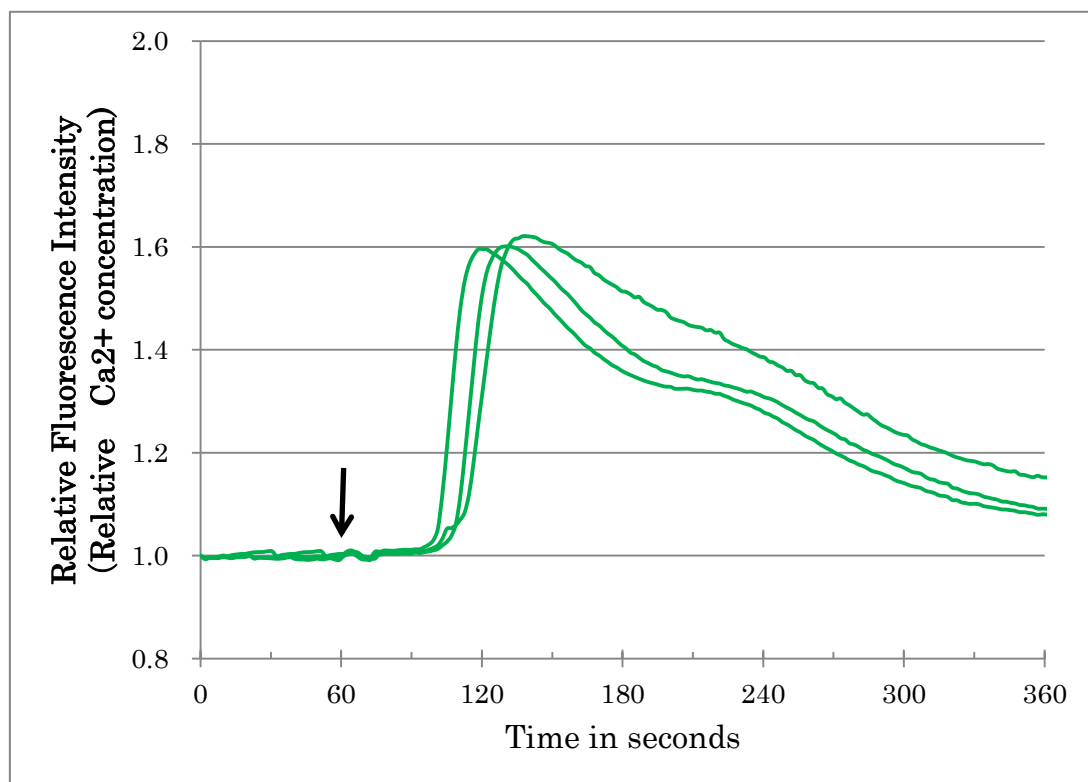


図 19 1-MA 添加後の未成熟卵母細胞における卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇

未成熟卵母細胞に  $1\ \mu\text{M}$  1-MA を添加し(60 sec、矢印)、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇を経時的に測定した。横軸は時間 (秒)、縦軸は  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、媒精前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (3 例)。

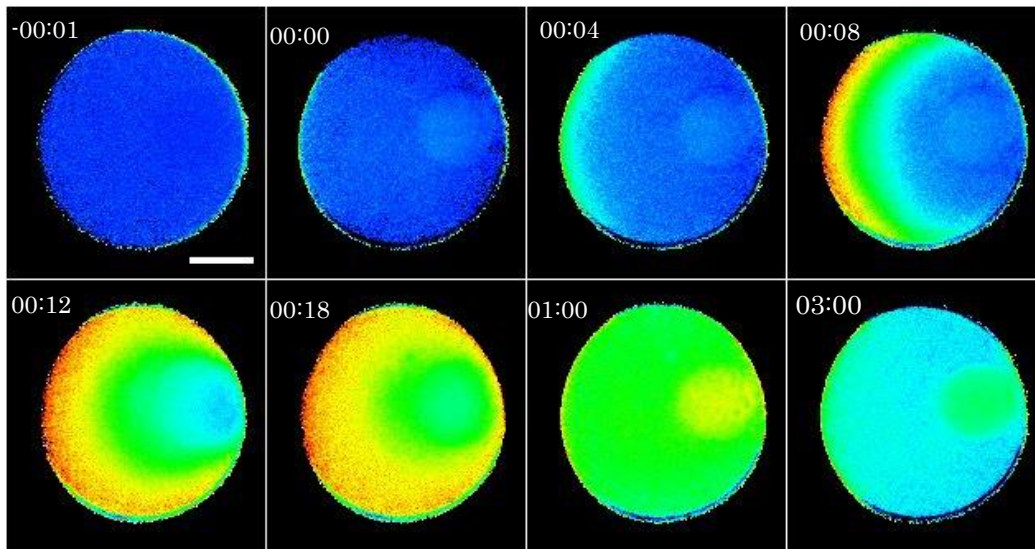
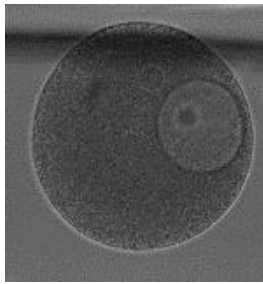


図 20 1-MA 添加後の未成熟卵母細胞における卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の時空間的測定

未成熟卵母細胞に  $1\ \mu\text{M}$  1-MA を加え、卵内  $\text{Ca}^{2+}$  変化を 1 秒毎に経時的に測定した。左上は 1-MA による卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇開始を 0 秒とした経過時間（分：秒）透過像は 1-MA 添加前、白線は  $50\ \mu\text{m}$  を示す。

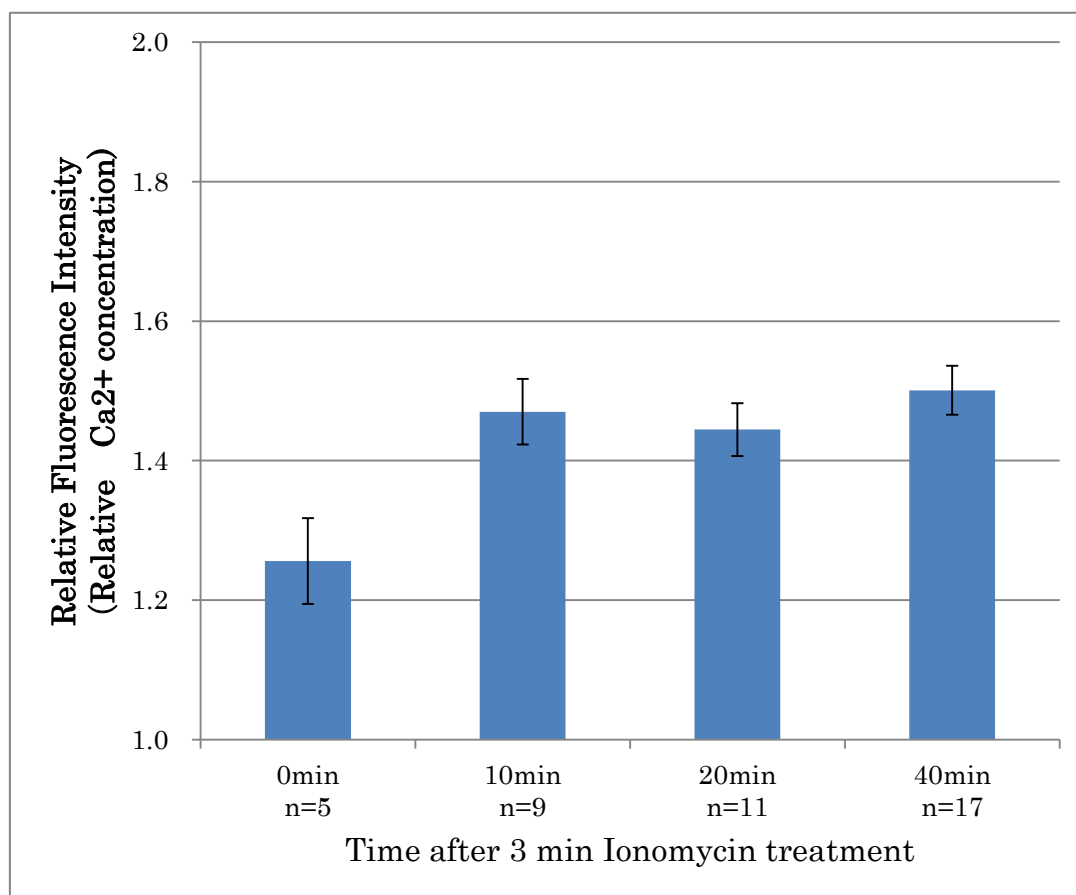


図 21 Ionomycin 処理未成熟卵母細胞における NADP 顕微注射時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値

未成熟卵母細胞を  $1 \mu\text{M}$  Ionomycin 海水中で 3 分間処理後、海水に戻し、それぞれの時間海水中でインキュベートした後に  $10 \text{ mM}$  NADP を顕微注射した。横軸は Ionomycin 処理前、処理後 10 分、20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵へ NADP を顕微注射した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、顕微注射前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す

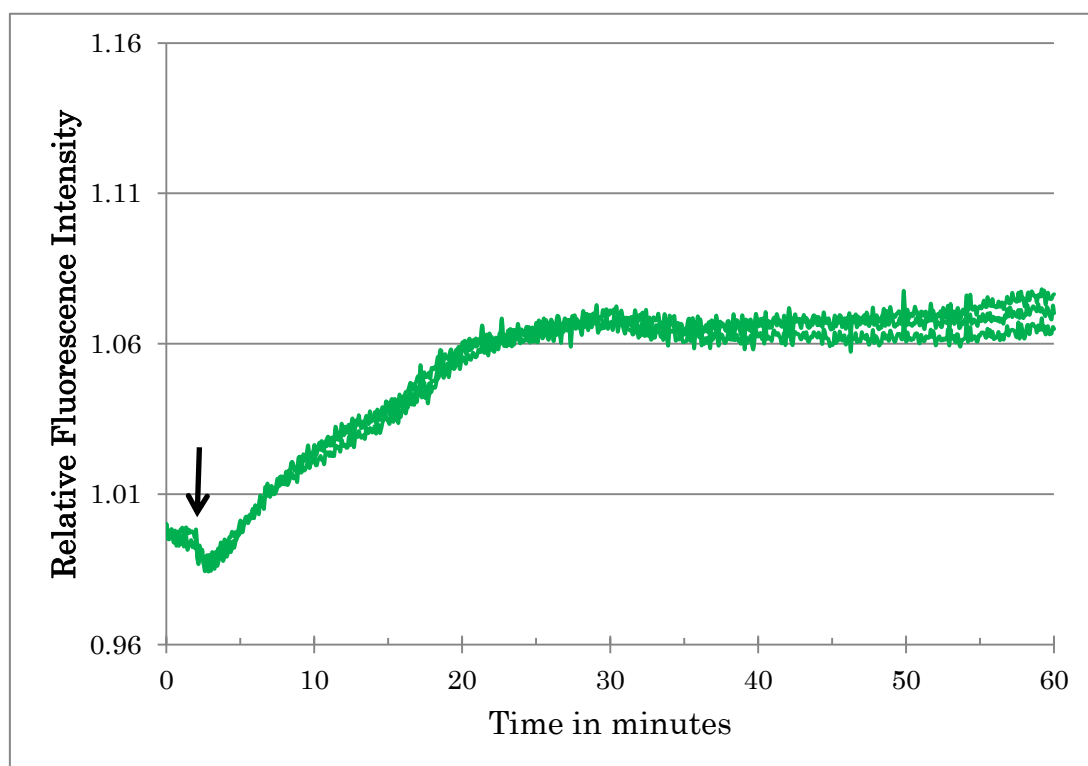


図 22 1-MA 添加後の未成熟卵母細胞における卵内 pH 変化

1 mM BCECF を顕微注射した未成熟卵に 1  $\mu$ M 1-MA を添加し、卵内 pH 変化を経時的に観察した。横軸は時間 (分)、縦軸はそれぞれの卵へ 1-MA を添加する前の蛍光値を「1」としたときの相対値で示した (3 例)。矢印は 1-MA 添加時を示す。

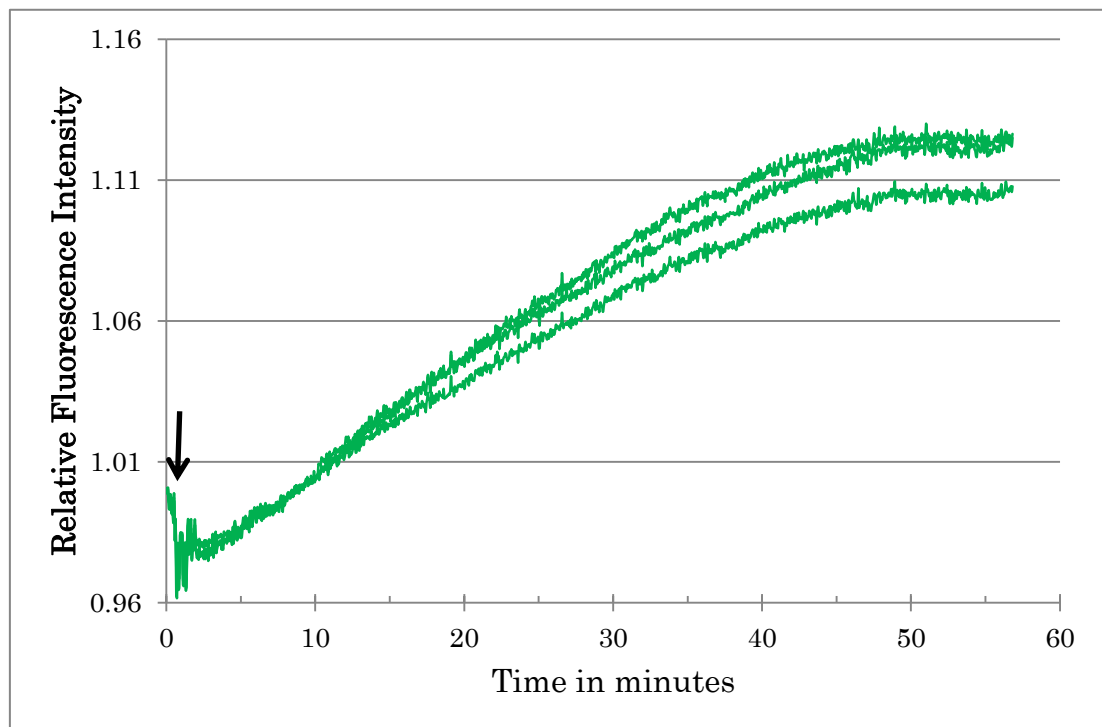


図 23  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加後の未成熟卵母細胞における卵内 pH の変化

1 mM BCECF を顕微注射した未成熟卵に 2 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  pH 7.5 をチェンバー内の海水量と等量添加し、卵内 pH 変化を経時的に観察した。横軸は時間（分）、縦軸はそれぞれの卵へ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を添加する前の蛍光値を 1 とした時の相対値で示した（3 例）。矢印は  $\text{NH}_4\text{Cl}$  添加時を示す。

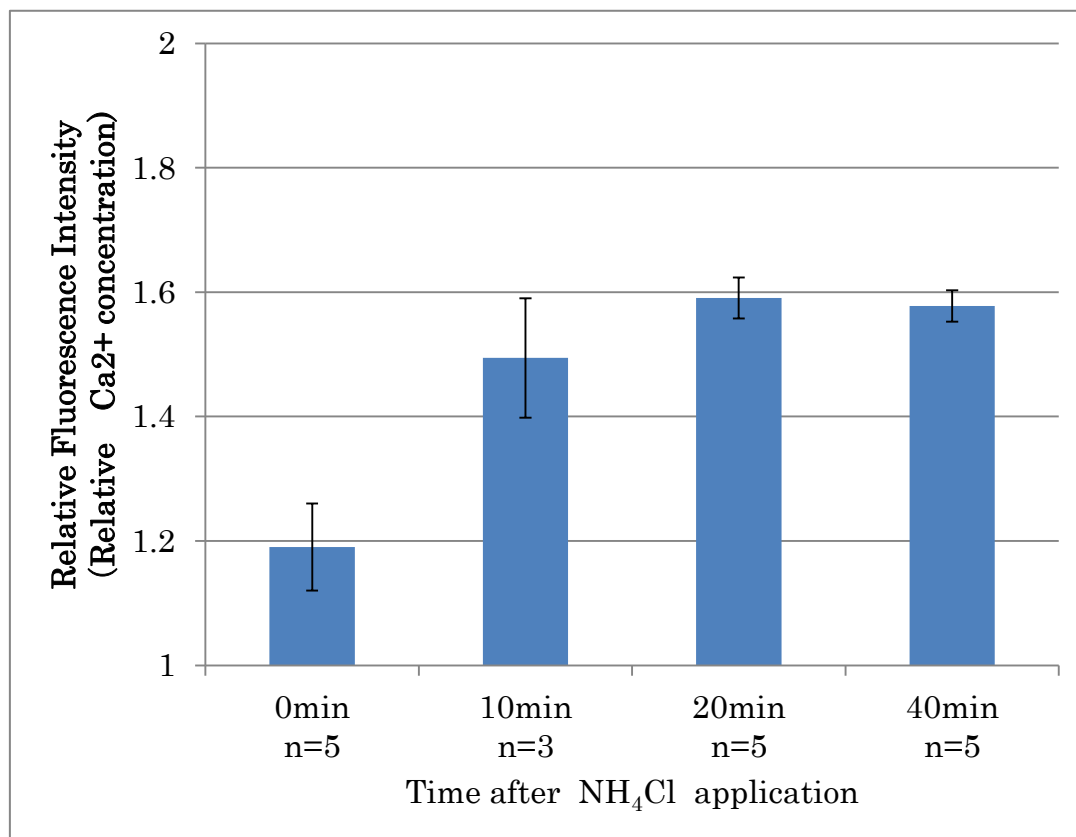


図 24  $\text{NH}_4\text{Cl}$  処理未成熟卵における NADP 顕微注射時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値

未成熟卵を 1 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  海水中 (pH 7.5) で 10 分、20 分、40 分処理した後、5 mM NADP を顕微注射した。0 分は  $\text{NH}_4\text{Cl}$  を処理していない未成熟卵に NADP を顕微注射した。横軸は  $\text{NH}_4\text{Cl}$  処理前 (0 分)、処理後 10 分、20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵へ NADP を顕微注射した時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、顕微注射前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。



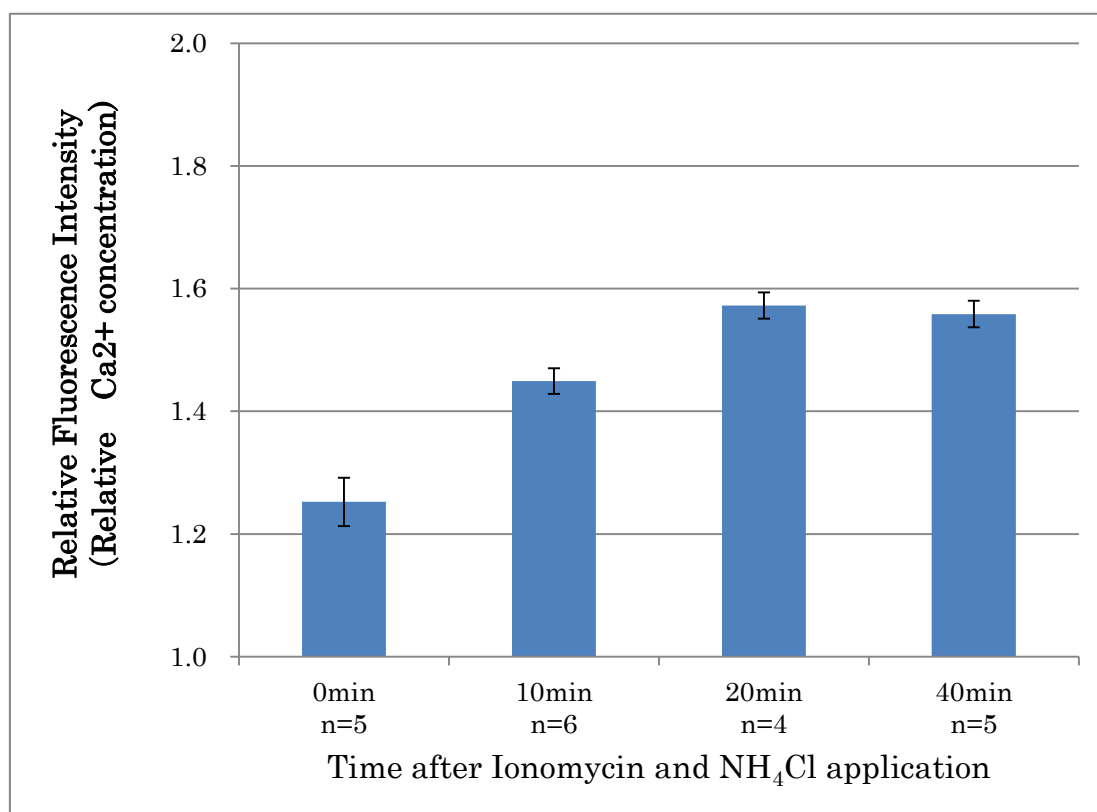


図 25 Ionomycin, NH<sub>4</sub>Cl 処理未成熟卵における NADP 顕微注射時の卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇ピーク値

未成熟卵を 1  $\mu$ M Ionomycin 海水中で 3 分間処理後、1 mM NH<sub>4</sub>Cl 海水中 (pH 7.5) に 10 分、20 分、40 分インキュベートした後、5 mM NADP を顕微注射した。0 分は Ionomycin 、NH<sub>4</sub>Cl を処理していない未成熟卵に NADP を顕微注射した。横軸は ionomycin+NH<sub>4</sub>Cl 処理前 (0 分)、処理後 10 分、20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵へ NADP を顕微注射した時の卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇ピーク値を、顕微注射前の蛍光値 (Ca<sup>2+</sup>濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

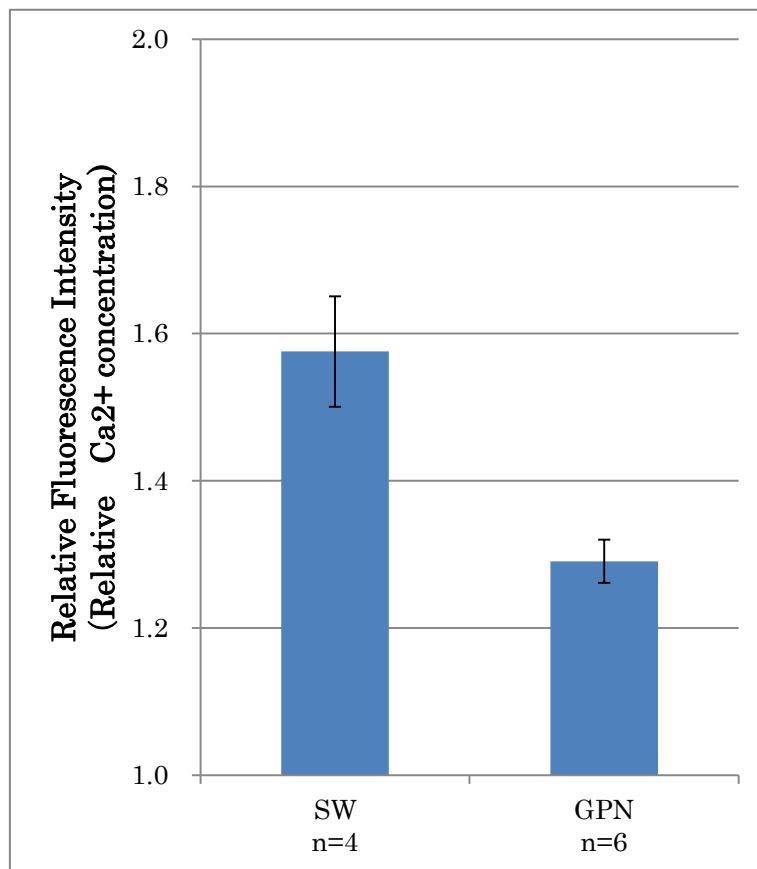


図 26 GPN 存在下における NAADP 顕微注射時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値

横軸は、成熟卵を 0.5mM の GPN 海水中で 10 分間処理後 100  $\mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した (GPN)。コントロールとして成熟卵に 100  $\mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した (SW)。

縦軸はそれぞれの成熟卵に 100  $\mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、顕微注射前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」とした時の相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

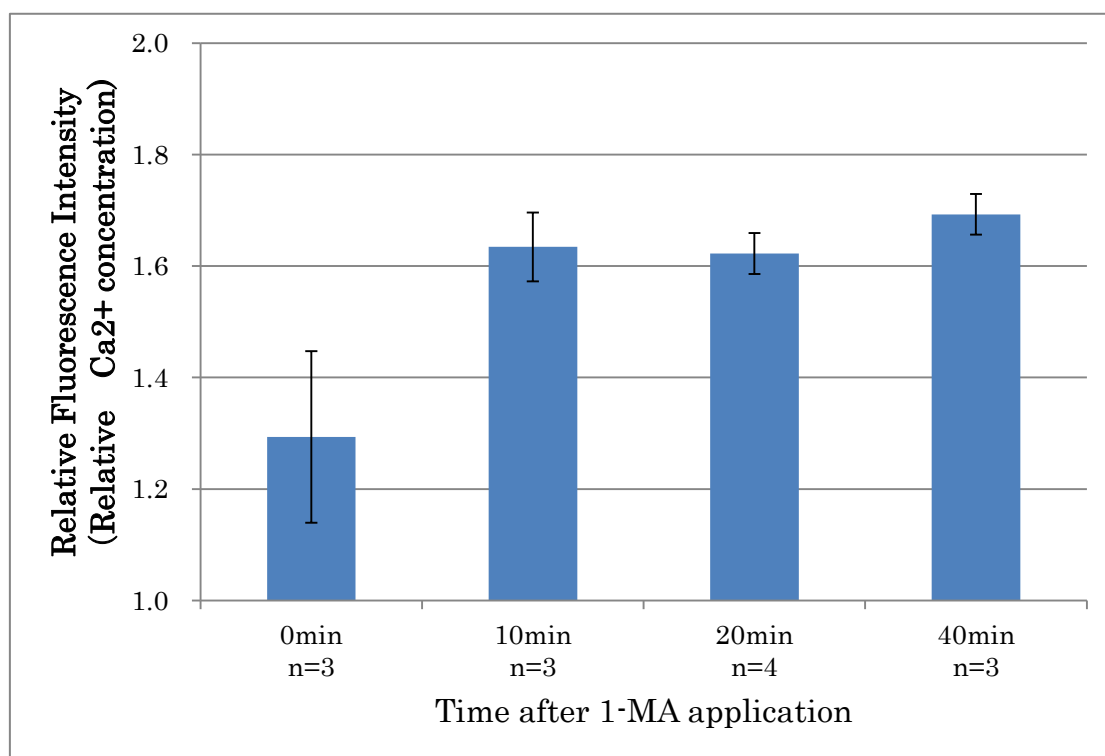


図 27 GPN 存在下における媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値の比較

未成熟卵に  $1\ \mu\text{M}$  1-MA 添加し 10 分、20 分、40 分インキュベートし、それぞれの媒精時 10 分前に、GPN を最終濃度で  $0.5\ \text{mM}$  となるよう添加した。0分は1-MAを添加せず、未成熟卵を  $0.5\text{mM}$  GPN 海水中で 10 分処理後に媒精した。横軸は 1-MA 添加前（0 分）、添加後 10 分、20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵へ NADP を顕微注射した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、媒精前の蛍光値（ $\text{Ca}^{2+}$  濃度）を「1」としたときの相対値で示した（グラフ上の各 bar は標準誤差を示す）。n は測定卵数を示す。

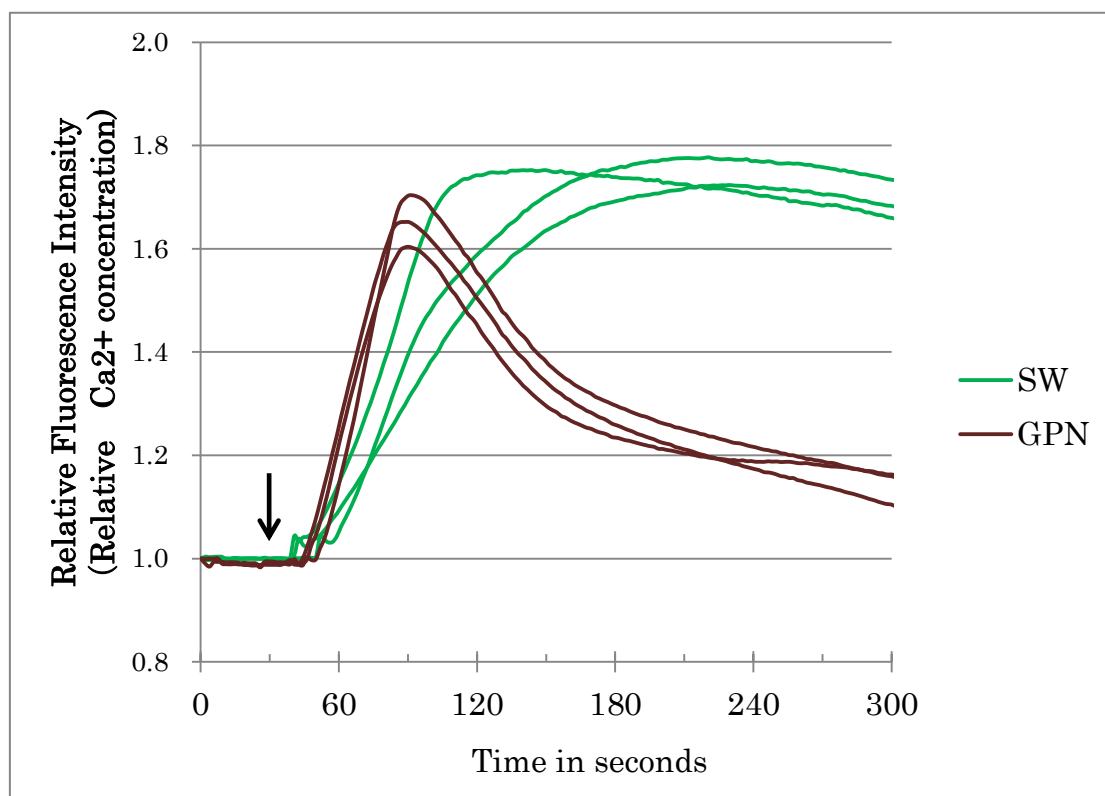


図 28 GPN 存在下における卵成熟途上卵（1-MA 添加後 20 分）媒精時の卵内 Ca<sup>2+</sup>変化

未成熟卵に 1  $\mu$ M 1-MA 添加し 10 分後に最終濃度 0.5 mM GPN を添加し、更に10分後に媒精した（GPN）。コントロールとして 1  $\mu$ M 1-MA 添加後 20 分の卵成熟途上卵に媒精した（SW）。矢印は媒精時間を示した。横軸は時間（秒）、縦軸はそれぞれの卵へ媒精前の蛍光値を 1 とした時の相対値で示した。

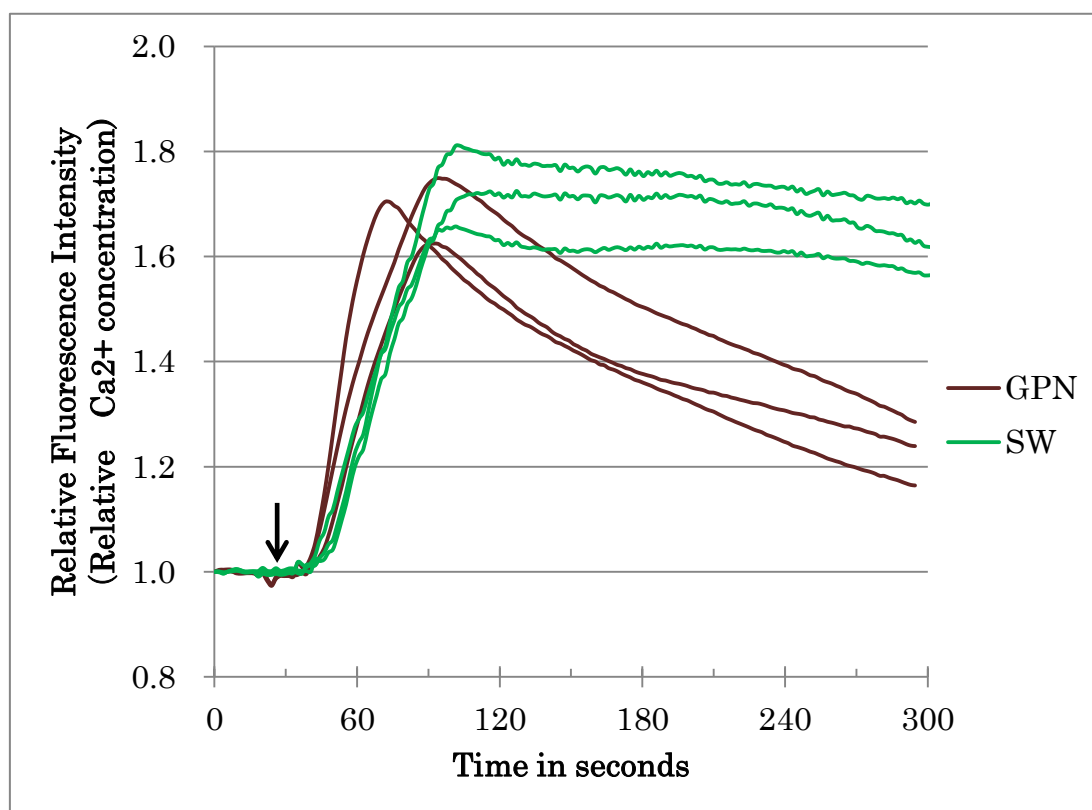


図 29 GPN 存在下における成熟卵（1-MA 添加後 40 分）媒精時の卵内 Ca<sup>2+</sup>変化

未成熟卵に 1  $\mu$ M 1-MA 添加し 30 分後に最終濃度 0.5 mM GPN を添加し、更に10分後に媒精した (GPN)。コントロールとして 1  $\mu$ M 1-MA 添加後 40 分の成熟卵に媒精した (SW)。矢印は媒精時間を示した。横軸は時間（秒）、縦軸はそれぞれの卵へ媒精前の蛍光値を 1 とした時の相対値で示した。

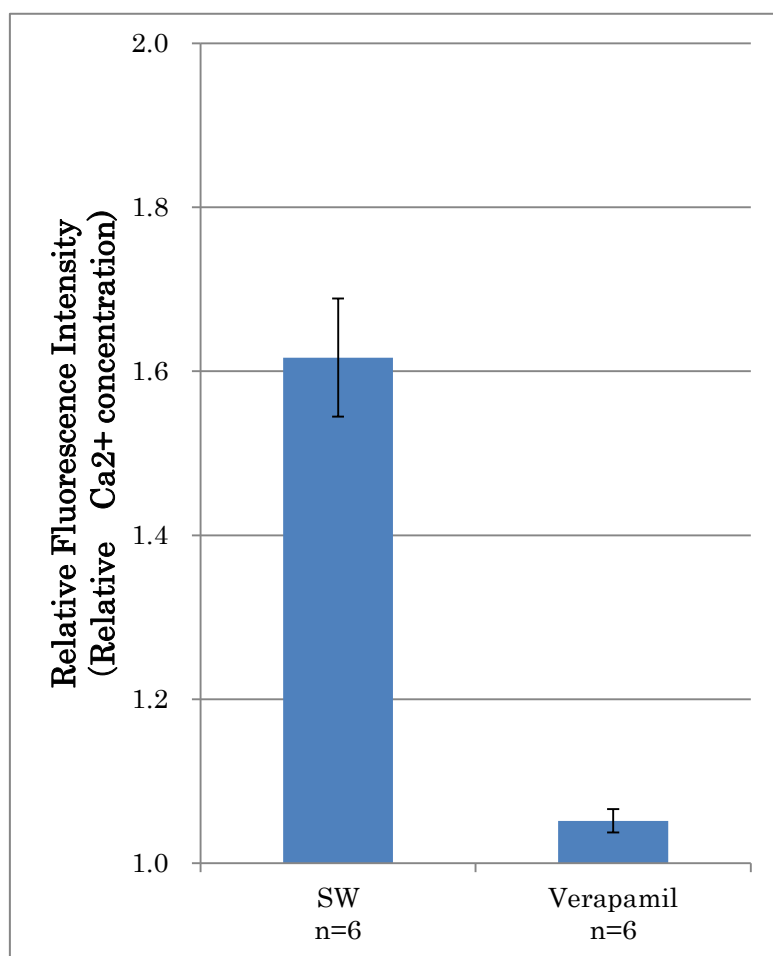


図 30 Verapamil 存在下における NAADP 顕微注射時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値

横軸は、成熟卵を 100  $\mu\text{M}$  Verapamil 海水中で 10 分間処理後、100  $\mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した (Verapamil)。コントロールとして成熟卵に 100  $\mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した (SW)。

縦軸はそれぞれの成熟卵に 100  $\mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、顕微注射前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」とした時の相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

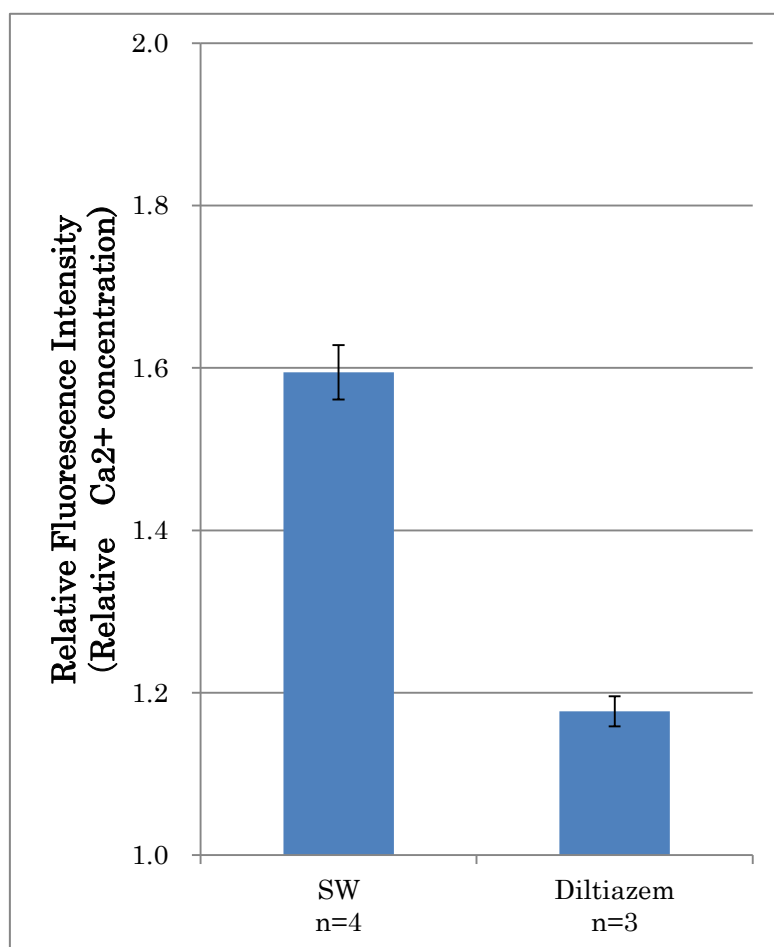


図 31 Diltiazem 存在下における NAADP 顕微注射時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値

横軸は、成熟卵を 100  $\mu\text{M}$  Diltiazem 海水中で 10 分間処理後、100  $\mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した (Diltiazem)。コントロールとして成熟卵に 100  $\mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した (SW)。縦軸はそれぞれの成熟卵に 100  $\mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、顕微注射前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」とした時の相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

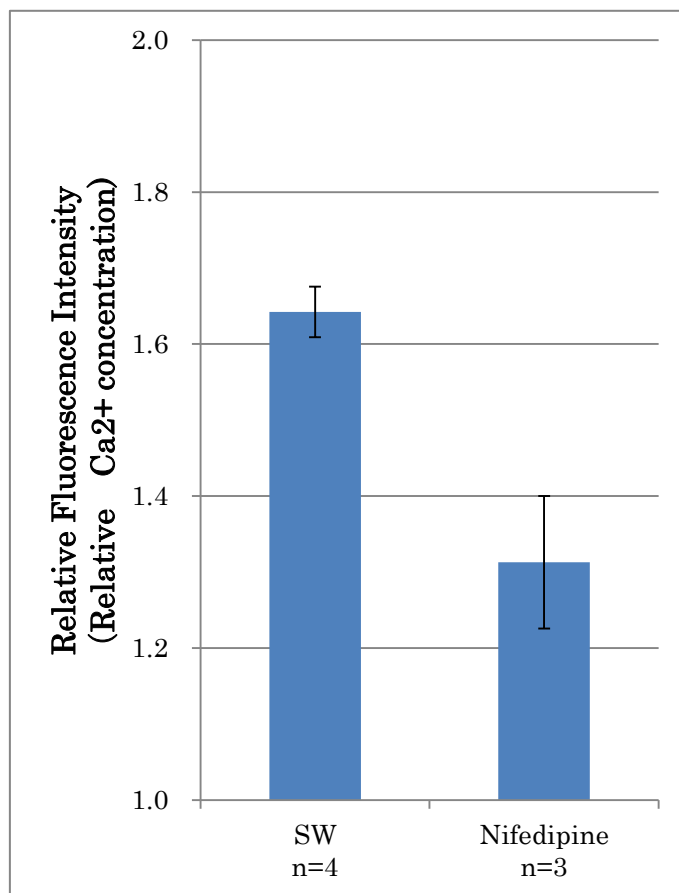


図 32 Nifedipine 存在下における NAADP 顕微注射時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値

横軸は、成熟卵を  $50 \mu\text{M}$  Nifedipine 海水中で 10 分間処理後、 $100 \mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した (Nifedipine)。コントロールとして成熟卵に  $100 \mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した (SW)。

縦軸はそれぞれの成熟卵に  $100 \mu\text{M}$  NAADP を顕微注射した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、顕微注射前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」とした時の相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。



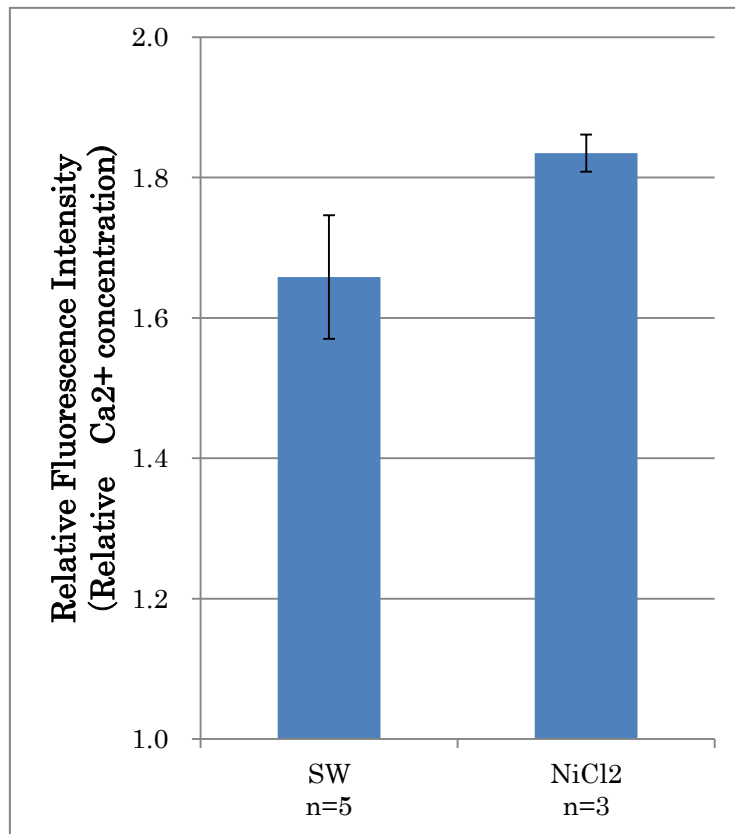


図 33 NiCl<sub>2</sub> 存在下における NAADP 顕微注射時の卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇ピーク値

横軸は、成熟卵を 50  $\mu$ M NiCl<sub>2</sub> 海水中で 10 分間処理後、100  $\mu$ M NAADP を顕微注射した (NiCl<sub>2</sub>)。コントロールとして成熟卵に 100  $\mu$ M NAADP を顕微注射した (SW)。

縦軸はそれぞれの成熟卵に 100  $\mu$ M NAADP を顕微注射した時の卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇ピーク値を、顕微注射前の蛍光値 (Ca<sup>2+</sup>濃度) を「1」とした時の相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

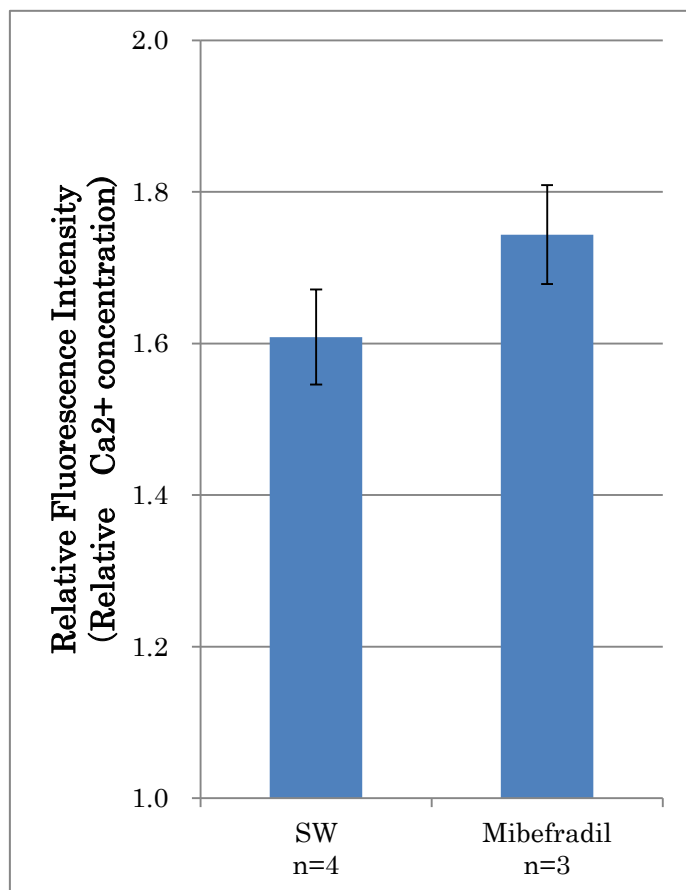


図 34 Mibefradil 存在下における NAADP 顕微注射時卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇ピーク値

横軸は、5  $\mu$ M Mibefradil 海水中で 10 分間処理後 100  $\mu$ M NAADP を顕微注射した (Mibefradil)。コントロールとして成熟卵に 100  $\mu$ M NAADP を顕微注射した (SW)。

縦軸はそれぞれの成熟卵に 100  $\mu$ M NAADP を顕微注射した時の卵内 Ca<sup>2+</sup>上昇ピーク値を、顕微注射前の蛍光値 (Ca<sup>2+</sup>濃度) を「1」とした時の相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

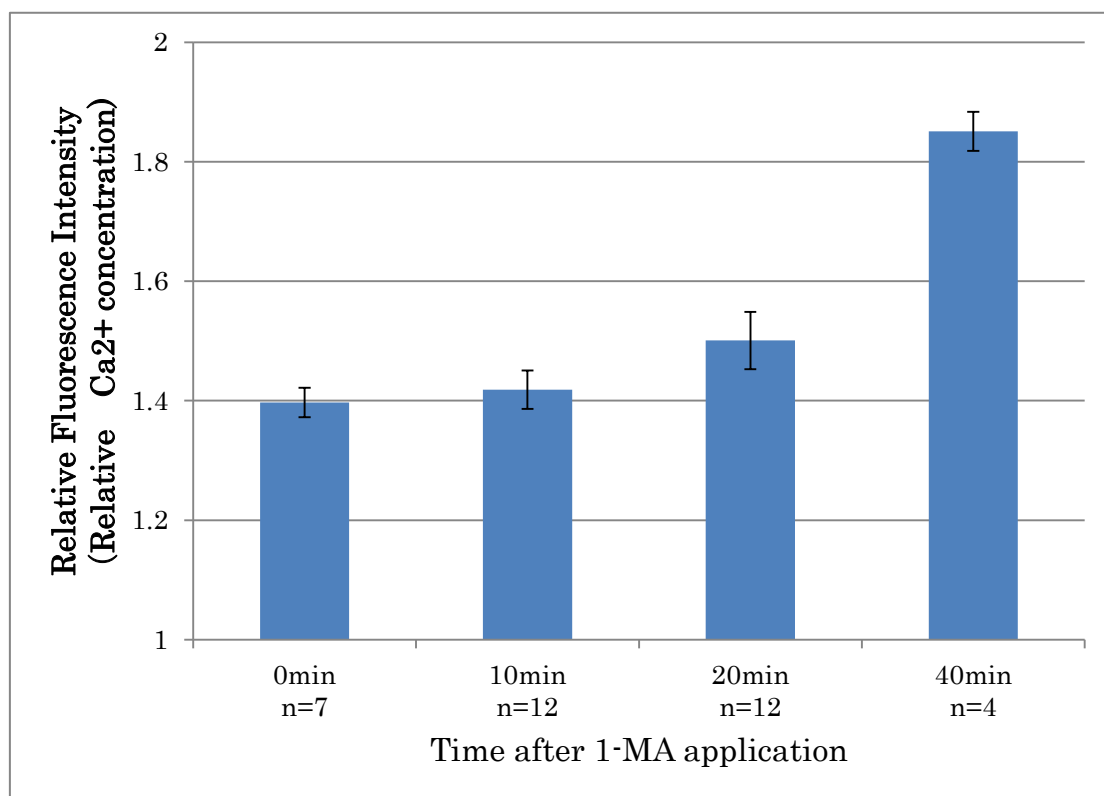


図 35 Verapamil 存在下における媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値の比較

未成熟卵に  $1\ \mu\text{M}$  1-MA 添加し 10 分、20 分、40 分インキュベートした。それぞれの時間の 10 分前に最終濃度  $100\ \mu\text{M}$  となるよう Verapamil を添加し、インキュベート後に媒精した。0分は 1-MA を添加せず、未成熟卵を  $100\ \mu\text{M}$  Verapamil 海水中で 10 分間インキュベート後に媒精した。横軸は 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵へ媒精した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、媒精前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

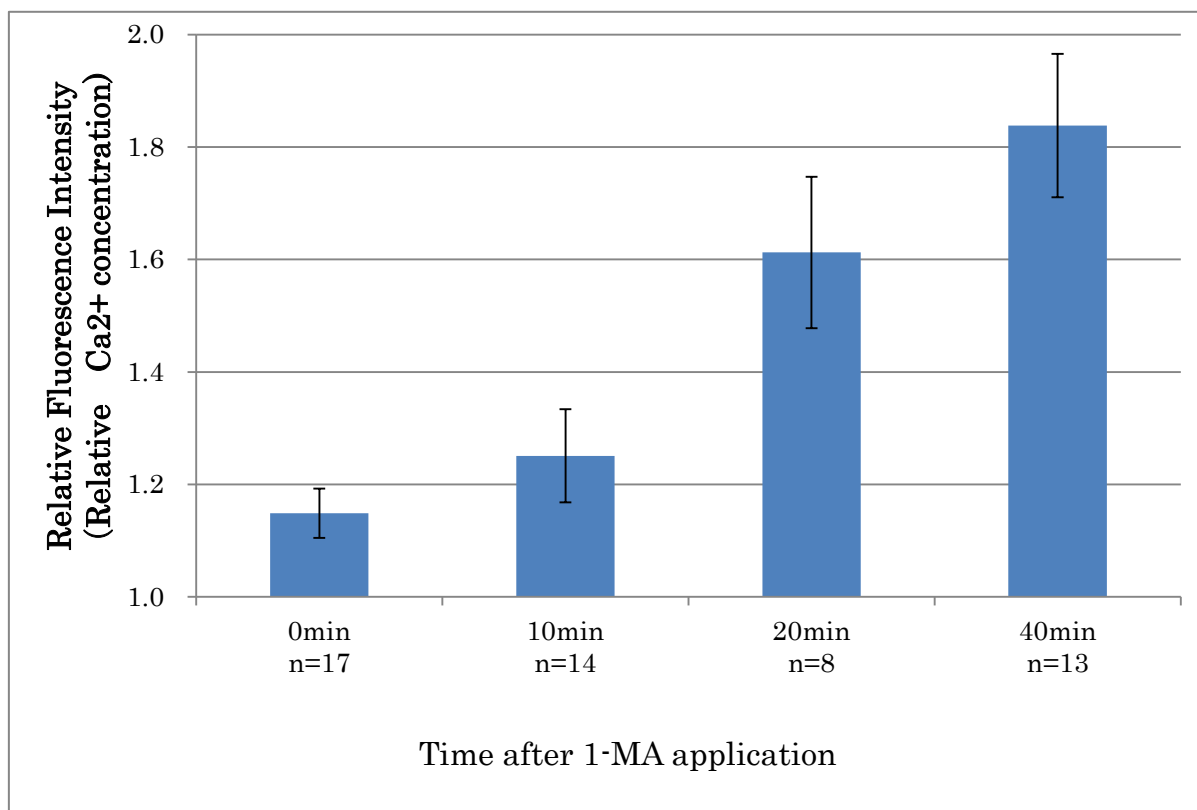
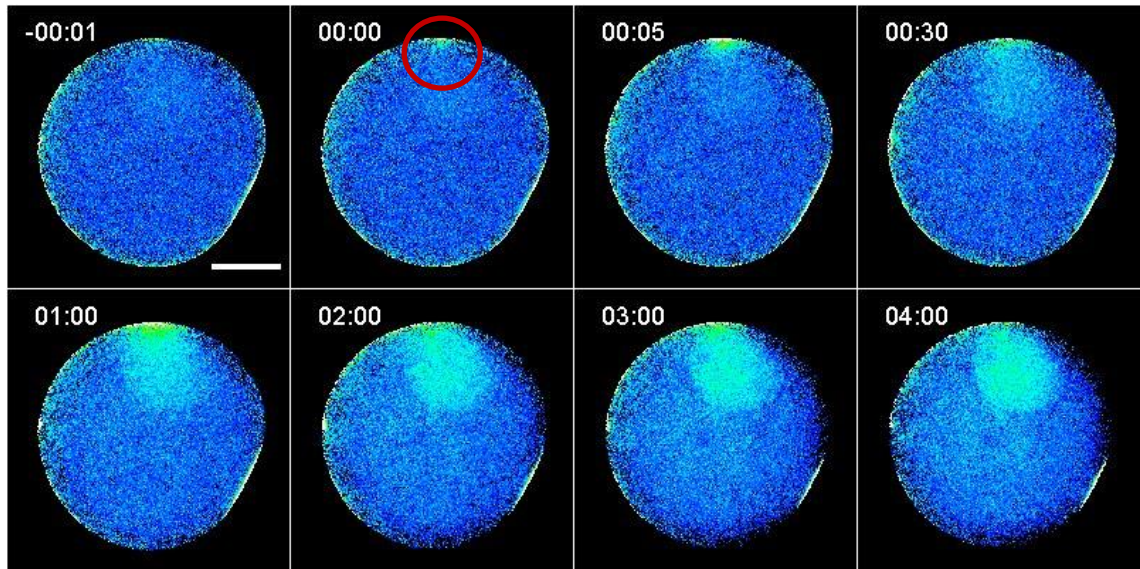


図 36 Cytochalasin B 存在下における媒精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値の比較

未成熟卵に  $1\ \mu\text{M}$  になるよう 1-MA を添加し 10 分、20 分、40 分処理後に媒精した。それぞれの媒精時の 5 分前に最終濃度  $5\ \mu\text{M}$  となるように Cytochalasin B を添加した。0分は1-MAを添加せずに、 $5\ \mu\text{M}$  Cytochalasin B 海水処理 5 分後に媒精した。横軸は 1-MA 添加前 (0 分)、添加後 10 分、20 分、40 分を、縦軸はそれぞれの卵へ媒精した時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇ピーク値を、媒精前の蛍光値 ( $\text{Ca}^{2+}$  濃度) を「1」としたときの相対値で示した (グラフ上の各 bar は標準誤差を示す)。n は測定卵数を示す。

A



B

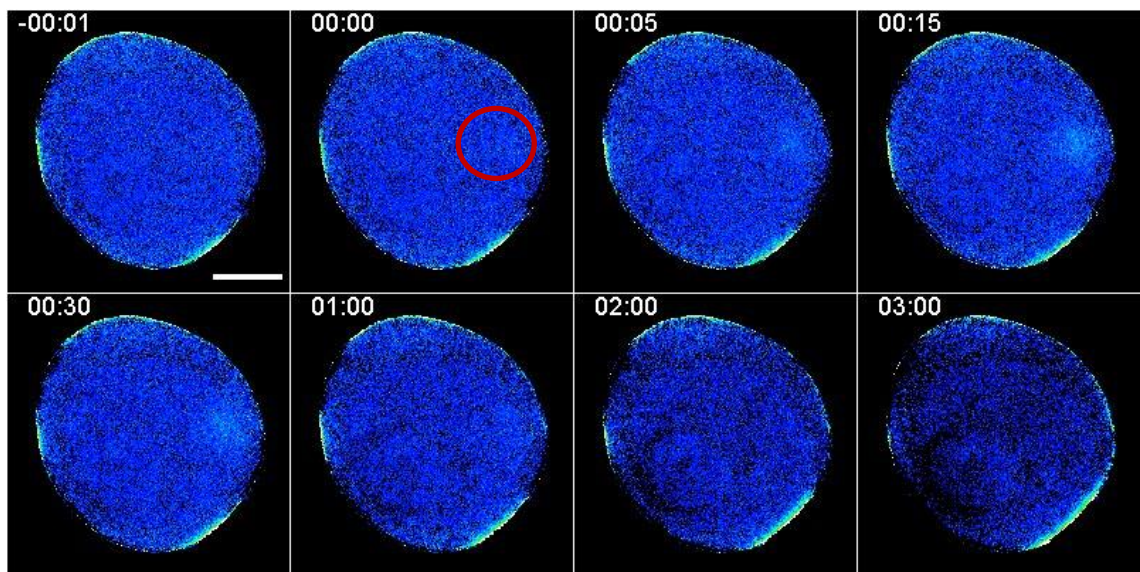


図 37 Cytochalasin B 存在下における媒精時の  $\text{Ca}^{2+}$  wave

A: 未成熟卵 (1-MA 添加前) を  $5\ \mu\text{M}$  Cytochalasin B 海水中で 5 分間処理した後、媒精した。B: 成熟途上卵 (1-MA 添加後 10 分)。未成熟卵を 1-MA 添加 5 分後に最終濃度  $5\ \mu\text{M}$  となるように Cytochalasin B を添加し、さらに 5 分間インキュベートした後に媒精した時の  $\text{Ca}^{2+}$  変化を 1 秒毎に経時的に観察した。A,B 共通で左上は  $\text{Ca}^{2+}$  wave の開始時間を 0 秒とした経過時間 (分: 秒) 精子侵入点を赤円で示した。

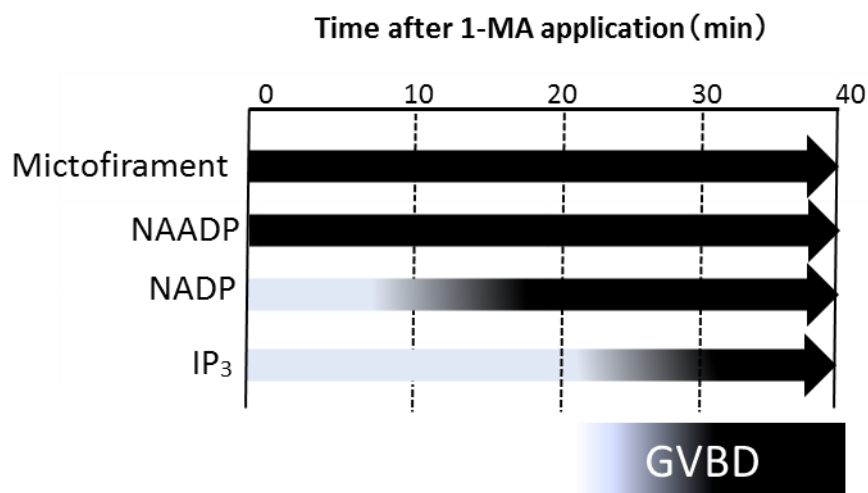


図 38 卵成熟過程における  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構発達

Actin microfibrament の関与する  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇は未成熟卵から機能していた。NAADP は未成熟卵より卵内  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇を誘起した。NADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構は 1-MA 添加後 10 分から発達し 20 分で成熟卵と同等の  $\text{Ca}^{2+}$ 上昇を誘起した。 $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構は、卵核胞の崩壊開始する 20 分以降に発達し、卵核胞の消失した成熟卵で強い活性を持った。

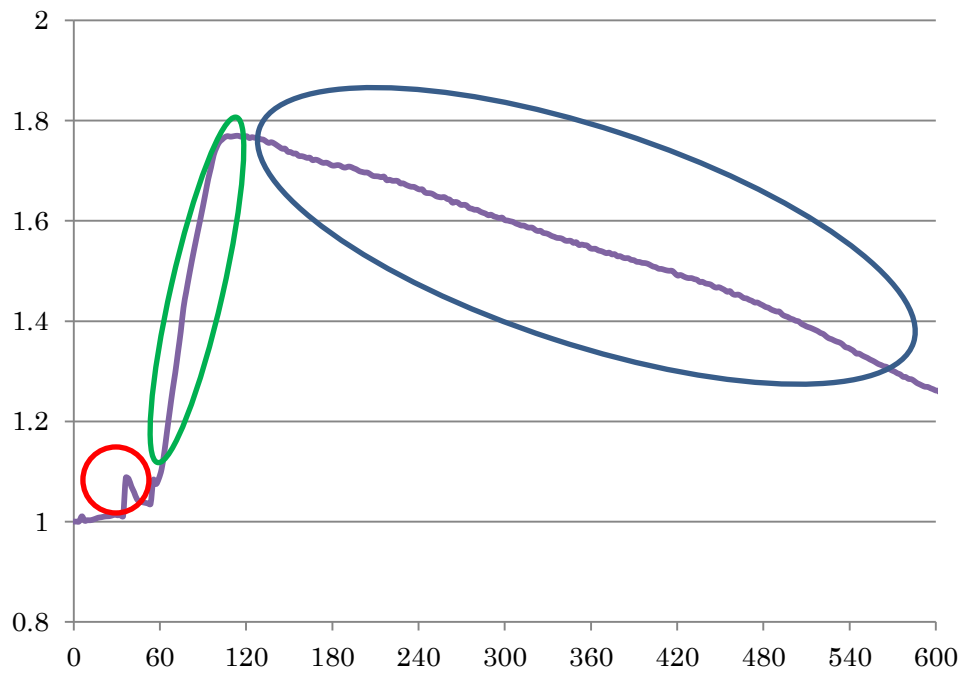


図 39 受精時の卵内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇パターンとそれぞれの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構の関与

受精時の  $\text{Ca}^{2+}$  上昇は

1. NAADP による cortical flash (赤丸)
2.  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、Actin microfilament、NADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構  $\text{Ca}^{2+}$  上昇 (緑丸)
3.  $\text{IP}_3$  依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構、NADP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構による  $\text{Ca}^{2+}$  の保持 (青丸)。